Série A, N° 3935
N° d'ordre :
4786

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

JEAN-MICHEL KIRRMANN

---

1re THÈSE. — EXPÉRIENCES DE RADIOPROTECTION ET DE RADIOSENSIBILISATION SUR DES ORGANES EMBRYONNAIRES DU POULET.

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 15 juin 1962 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ..... *Président.*
GALLIEN ..... } *Examinateurs.*
TONNELAT ... }

---

PARIS

Éditions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1963

Série A, n° 3935
N° d'ordre :
4786

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

JEAN-MICHEL KIRRMANN

---

1re THÈSE. — Expériences de radioprotection et de radiosensibilisation sur des organes embryonnaires du poulet.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

**Soutenues le 15 juin 1962 devant la Commission d'examen.**

MM. GRASSÉ..... *Président.*
GALLIEN ..... } *Examinateurs.*
TONNELAT ... }

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PARIS

Éditions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1963

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

*Doyen* ..... M. ZAMANSKY.

## PROFESSEURS

| | | |
|---|---|---|
| G. JULIA ..... | T | Analyse supérieure et Algèbre supérieure. |
| DE BROGLIE ..... | T | Théories physiques. |
| PRENANT ..... | T | Anatomie et Histologie comparées. |
| GRASSÉ ..... | T | Évolution des êtres organisés. |
| PRÉVOST ..... | T | Chimie organique. |
| CHAUDRON ..... | T | Chimie appliquée. |
| WYART ..... | T | Minéralogie et Cristallographie. |
| TEISSIER ..... | T | Zoologie. |
| MANGENOT ..... | T | Biologie végétale (Orsay). |
| P. ALGER ..... | T | Physique quantique et Relativité. |
| MONNIER ..... | T | Physiologie générale. |
| PIVETEAU ..... | T | Paléontologie. |
| ROCARD ..... | T | Physique (E.N.S.). |
| H. CARTAN ..... | T | Mathématiques (E.N.S.) |
| LAFFITTE ..... | T | Chimie générale. |
| FAVARD ..... | T | Géométrie supérieure. |
| COULOMB ..... | T | Physique du Globe. |
| M[lle] COUSIN ..... | T | Biologie animale (S.P.C.N.). |
| CHRÉTIEN ..... | T | Chimie minérale. |
| P. DRACH ..... | T | Zoologie. |
| KASTLER ..... | T | Physique (E.N.S.). |
| EPHRUSSI ..... | T | Génétique. |
| RIVIÈRE ..... | T | Géologie S.P.C.N. et sédim. |
| GAUTHERET ..... | T | Biologie vég. (P.C.B.). |
| R. LUCAS ..... | T | Recherches physiques. |
| A. THOMAS ..... | T | Biologie cellulaire. |
| ARNULF ..... | T | Optique appliquée. |
| MAX MORAND ..... | T | Physique. Enseignement. |
| SOLEILLET ..... | T | Physique (P.C.B.). |
| FORTIER ..... | T | Mécanique expérimentale des fluides. |
| DANJON ..... | T | Astronomie. |
| PETIT ..... | T | Biologie maritime. |
| QUENEY ..... | T | Météorologie et dynamique atmosphérique. |
| GALLIEN ..... | T | Embryologie. |
| LECHORN ..... | T | Botanique. |
| DE CUGNAC ..... | T | Biologie végétale (S.P.C.N.). |
| M[lle] CAUCHOIS ... | T | Chimie physique. |
| THELLIER ..... | T | Physique du Globe. |
| L'HÉRITIER ..... | T | Biologie générale (Orsay). |
| GHIVET ..... | T | Radioélectricité (Orsay). |
| PONCIN ..... | T | Mécanique générale. |
| DUBREIL ..... | T | Arithmétique et théorie des nombres. |
| QUELET ..... | T | Chimie organique. |
| CAGNIARD ..... | T | Géophysique appliquée. |
| CHAMPETIER ..... | T | Chimie macromoléculaire. |
| CUVILLIER ..... | T | Micropaléontologie. |
| JUNG ..... | T | Pétrographie. |
| TRILLAT ..... | T | Microscopie et diffraction électronique. |
| WIEMANN ..... | T | Chimie org. et structurale. |
| JACQUINOT ... .... | T | Spectroscopie et physique céleste (Orsay). |
| VASSY ..... | T | Physique de l'atmosphère. |
| DESTOUCHES ..... | T | Théories physiques. |
| AMIEL ..... | T | Chimie générale. |
| HOCART ..... | T | Minéralogie et Cristallographie. |
| J.-P. MATHIEU ... | T | Physique (Optique). |
| COUTEAUX ..... | T | Biologie animale (P.C.B.) |
| MAY ..... | T | Zoologie (Orsay). |
| CHOQUET ..... | T | Théorie des fonctions et Topologie. |
| FELDMANN ..... | T | Biologie végét. marine. |
| GUINIER ..... | T | Physique des solides (Orsay). |
| JOST ..... | T | Physiologie comparée. |
| FORTET ..... | T | Calcul des Probabilités et Physique mathém. |
| SCHWARTZ ..... | T | Calcul différentiel et intégral. |
| CHOUARD ..... | T | Physiologie végétale. |
| MALAVARD ..... | T | Aviation (Techn. Aéronautique). |
| BRELOT ..... | T | Calcul diff. et intégral. |
| NORMANT ..... | T | Synthèse organique générale. |
| BÉNARD ..... | T | Chimie minérale. |
| BUVAT ..... | T | Botanique (E.N.S.). |
| DUGUÉ ..... | T | Statistiques mathématiques. |
| SOULAIRAC ..... | T | Psychophysiologie. |
| ULRICH ..... | T | Physiologie végétale. |
| MAHÉCHAL ..... | T | Optique théorique et appliquée. |
| KIRRMANN ..... | T | Théories chimiques. |
| CHADEFAUD ..... | T | Botanique. |
| M[lle] LE BRETON .. | T | Physiologie de la Nutrit. |
| SALEM ..... | T | Mathématiques générales. |
| LELONG ..... | T | Applic. de l'analyse à la Géométrie. |
| DEVILLERS ..... | T | Anatomie et Histologie comparées. |
| EHRESMANN ..... | T | Topologie algébrique. |
| FRANÇON ..... | T | Physique (S.P.C.N.). |
| GLANGEAUD ..... | T | Géographie physique et Géologie dynamique. |
| GODEMENT ..... | T | Mathémat. (M.P.C.). |
| PISOT ..... | T | Tech. mathém. de la Physique. |
| E. ROCH ..... | T | Géologie. |
| SCHATZMANN ..... | T | Astrophysique. |
| TERMIER ..... | T | Paléontologie stratigraphique. |
| ZAMANSKY ..... | T | Mathématiques générales. |
| LENNUIER ..... | T | Physique (M.G.P.). |
| RIZET ..... | T | Génétique (Orsay). |
| ROUTHIER ..... | T | Géologie appliquée. |
| M[me] TONNELAT .... | T | Physique théorique. |
| DIXMIER ..... | T | Mathématiques (M.P.C.). |
| SOUCHAY ..... | T | Chimie générale. |
| AIGRAIN ..... | T | Électrotechn. générale. |
| BRUSSET ..... | T | Chimie systématique. |
| M. LEVY ..... | T | Physique théorique des hautes énergies (Orsay). |
| M[me] CHAIX ..... | T | Chimie biologique. |
| M[me] HUREL-PY ... | | Biologie végétale (P.C.B.). |

# PROFESSEURS *(suite)*

| | | |
|---|---|---|
| PIAUX | T | Chimie (M.P.C.). |
| BRUN | T | Mécan. théorique des Fluides. |
| LEDERER | T | Chimie biologique. |
| Mme DUBREIL | T | Mathématiques (Agrég.). |
| Mme LELONG | T | Mathématiques (E.N.S.). |
| BELLAIR | T | Géologie (S.P.C.N.). |
| COTTE | T | Physique (M.P.C.). |
| J. E. DUBOIS | T | Chimie organique. |
| LAMOTTE | T | Zoologie (E.N.S.). |
| André MICHEL | T | Chimie minérale (Orsay). |
| OLMER | T | Énergétique générale. |
| ROUAULT | T | Électricité (Orsay). |
| GAUTHIER | T | Mécanique appliquée. |
| BARCHEWITZ | T | Chimie physique. |
| BROSSEL | T | Physique atomique. |
| BUSER | T | Physiologie comparée. |
| CAMUS | T | Physiologie vég. (B.M. P.V.). |
| CASTAING | T | Physique (Orsay). |
| CURIEN | T | Minéralogie et cristallographie. |
| MOYSE | T | Physiol. vég. (Orsay). |
| NOIROT | T | Évolution des Êtres Org. |
| PANNETIER | T | Chimie générale (Orsay). |
| POSSOMPES | T | Zoologie. |
| PULLMAN | T | Chimie théorique. |
| TEILLAC | T | Phys. nucl. et Radioactivité. |
| TONNELAT | T | Biologie physico - chimique. |
| VILLE | T | Économétrie. |
| WILLEMART | T | Chimie (P.C.B.). |
| DODÉ | T | Chimie (Orsay). |
| FREYMANN | T | Recherches physiques. |
| GUINOCHET | T | Biol. vég. (S.P.C.N.) (Orsay). |
| ROLLET | T | Chimie (P.C.B.). |
| Mlle JOSIEN | T | Chimie (S.P.C.N.). |
| CHEVALLEY | T | Géométrie algébrique et Théorie des groupes. |
| ARNOULT | T | Électronique (Orsay). |
| CHAPELLE | T | Physique (Orsay). |
| DELANGE | T | Mathématiques (Orsay). |
| DENY | T | Mathématiques générales (Orsay). |
| GERMAIN | T | Mécanique théorique des fluides. |
| G. LUCAS | T | Géologie. |
| ALLARD | T | Chimie physique. |
| BERTHELOT | T | Physique fondamentale des hautes énergies (Orsay). |
| BRICARD | T | Météorologie et phys. de l'Atmosphère. |
| Mme ALBE-FESSARD | T | Psycho-physiologie. |
| FRIEDEL | T | Physique des Solides (Orsay). |
| M. JULIA | | Étude des Moléculaires naturelles complexes. |
| LENDET | T | Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay). |
| MAGAT | | Physicochimie des Radioéléments. |
| Mlle QUINTIN | T | Électrochimie. |
| MONOD | T | Chimie du Métabolisme. |
| BENOIT | T | Physiologie animale (Orsay). |
| DE POSSEL | T | Analyse numérique. |
| CHARLOT | T | Chimie analytique. |
| HAÏSSINSKY | T | Radiochimie. |
| LEMÉE | T | Physiologie vég. (B.M. P.V). (Orsay). |
| GUÉRIN | T | Chimie (M.P.C.) (Orsay). |
| M. CHATELET | T | Chimie (P.C.B.). |
| JEAN | T | Physique nucléaire (Orsay). |
| MATTLER | T | Physique (S.P.C.N.). |
| Louis MICHEL | T | Phys. théor. des Hautes Énergies (Orsay). |
| BERGERARD | T | Zoologie (Orsay). |
| BERTEIN | T | Électronique (Orsay). |
| BOUISSIÈRES | T | Chimie des Radioéléments (Orsay). |
| Mme COUTURE | T | Thermodynamique et Méc. physique. |
| ELLENBERGER | T | Géologie appl. sur le terr. |
| FRANC | | Biologie animale (P.C.B.). |
| SCHNELL | | Botanique tropicale (Orsay). |
| STOLKOWSKI | | Physiologie générale. |
| ACHER | | Chimie biologique (Orsay). |
| BAUDOIN | | Biologie anim. (P.C.B.). |
| BEAUMONT | | Biolog. anim. (S.P.C.N.). |
| BLAMONT | T | Géophysique Ionosphère. |
| BOURREAU | | Botanique. |
| D. CURIE | | Physique (M.G.P.). |
| DURAND-DELGA | | Géologie. |
| FRÉON | T | Chimie organique (Orsay). |
| HELLER | T | Physiologie végétale. |
| TORTRAT | T | Calcul des Probabilités. |
| CAILLEUX | | Géologie (S.P.C.N.). |
| MAGNAN | T | Physique (S.P.C.N.). |
| DAUDEL | T | Mécanique ondulatoire appl. à la Chim. théor. et à la Phys. nucléaire. |
| Mlle FOURCROY | | Biologie végétale (S.P.C.N.). |
| Mme CHOQUET-BRUHAT | T | Méc. analytique et Méc. céleste. |
| Mlle VEIL | | Physiologie générale. |
| LWOFF | T | Microbiologie. |
| SIESTRUNCK | T | Mécanique physique et expérimentale. |
| LACOMBE | T | Métallurg. des métaux nucl. |
| BROCHARD | T | Physique (P.C.B.) (Orsay). |
| CABANNES | T | Mécanique générale. |
| LESIEUR | T | Mathématiques (M.P.C.) (Orsay) |
| MAZET | T | Mécanique générale (Orsay). |
| CAIRE | | Géographie phys. et Géologie dynamique. |
| COMOLET | T | Mécanique des Fluides. |
| CORABŒUF | | Physiologie animale. |
| DELLOUE | | Physique de l'Exosphère. |
| GORENFLOT | | Botanique II (Orsay). |
| HOUILLON | | Biol. animale (P.C.B.). |
| J. JULLIEN | | Chimie (P.C.B.). |
| MALGRANGE | T | Tech. math. de la Phys. |
| OLIVIER | | Anthropologie. |
| NOZERAN | T | Botanique II (Orsay). |
| BLANC-LAPIERRE | T | Physique (E.N.S.) (Orsay). |
| CHEVAUGEON | T | Botanique (Orsay). |
| KAHANE | T | Mathématiques (Orsay). |
| SAMUEL | T | Math. (E.N.S. féminine). |
| KOURGANOFF | T | Astronomie (Orsay). |
| THIRY | T | Mécanique céleste. |

*Secrétaire Général* ..... R. POULLAIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538112_0097

J.-M. KIRRMANN

# EXPÉRIENCES DE RADIOPROTECTION ET DE RADIOSENSIBILISATION SUR DES ORGANES EMBRYONNAIRES DU POULET

## *SOMMAIRE*

Pages

INTRODUCTION . . . . . 367

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER . . . . . 369

I. — *Historique* . . . . . 369
II. — *Position du problème* . . . . . 369
III. — *Matériel et méthodes* . . . . . 371

A. — Technique d'irradiation . . . . . 371
1) Méthode d'irradiations localisées . . . . . 371
2) Caractéristiques du rayonnement . . . . . 371

B. — La cyclocéphalie . . . . . 373
C. — Technique d'injection . . . . . 375
D. — Technique d'incubation en atmosphère gazeuse . . 377
E. — Méthodologie . . . . . 378
F. — Notion de quantité de protection. . . . . 379
G. — Résumé et processus expérimental pratique. . . . 379

CHAPITRE II. — RADIOPROTECTION *IN VIVO* . . . . . 383

I. — *La cystéamine* . . . . . 383

A. — Introduction . . . . . 383
B. — Effet radioprotecteur . . . . . 383

II. — *Le bleu de méthylène* . . . . . 386

A. — Introduction . . . . . 386
B. — Effet du bleu de méthylène seul . . . . . 387
C. — Effet radioprotecteur . . . . . 388
D. — Essais de réduction du bleu de méthylène . . . . 389
E. — Effet radioprotecteur du leucodérivé. . . . . 390
F. — Expériences complémentaires. . . . . 393
G. — Conclusions . . . . . 393

III. — *Le cyanure*. . . . . 393

A. — Action du cyanure seul . . . . . 394
B. — Effet radioprotecteur . . . . . 395
C. — Conclusion . . . . . 395

Pages

IV. — *L'acide ascorbique* . . . . . 395

A. — Action de l'acide ascorbique seul . . . . . 396
B. — Effet radioprotecteur . . . . . 396
C. — Conclusions . . . . . 397

V. — *Le diéthyldithiocarbamate de sodium* . . . . . 397

A. — Action du DDC seul . . . . . 397
B. — Effet radioprotecteur . . . . . 398
C. — Conclusion . . . . . 400

VI. — *La 8-oxyquinoline* . . . . . 401

A. — Effet de la 8-oxyquinoline seule . . . . . 401
B. — Effet radioprotecteur . . . . . 401

VII. — *L'hyposulfite de sodium* . . . . . 403

VIII. — *L'anoxie* . . . . . 403

A. — Introduction . . . . . 403
B. — Action radioprotectrice de l'hydrogène . . . . . 405
C. — Action de l'azote . . . . . 408
D. — Action de l'anhydride carbonique . . . . . 410
E. — Comparaison des résultats et conclusion . . . . . 411

IX. — *Radiosensibilisation par l'oxygène* . . . . . 412

A. — Technique et action de l'$O_2$ seul . . . . . 412
B. — Résultats . . . . . 412
C. — Expériences complémentaires . . . . . 414
D. — Conclusions . . . . . 414

X. — *Sensibilisation par le bleu de méthylène* . . . . . 414

XI. — *Sensibilisation par le permanganate de potassium* . . . . . 415

DEUXIÈME PARTIE. — RADIOPROTECTION *IN VITRO*

INTRODUCTION ET HISTORIQUE . . . . . 417

CHAPITRE PREMIER. — MATÉRIEL ET MÉTHODES . . . . . 417

I. — *Choix des organes et technique de culture* . . . . . 417

II. — *Technique d'imprégnation* . . . . . 419

III. — *Technique d'irradiation* . . . . . 419

IV. — *Processus expérimental* . . . . . 420

1) Intestin . . . . . 420
*a*) Aspect macroscopique . . . . . 420
*b*) Aspect microscopique . . . . . 420

2) Testicules . . . . . 421

CHAPITRE II. — RÉSULTATS . . . . . 421

I. — *Action des rayons X* . . . . . 421

A. — Intestin . . . . . 421
B. — Testicules . . . . . 422

II. — *Action de la cystéamine* . . . . . 423

A. — Intestin . . . . . 423
B. — Testicules . . . . . 425

Pages

III. — *Action du bleu de méthylène* . . . . . 425

A. — Effet du bleu de méthylène seul . . . . . 426
B. — Expériences de radioprotection . . . . . 426
C. — Expériences complémentaires. . . . . 427
D. — Conclusion . . . . . 427

IV. — *Action de l'anoxie*. . . . . 427

A. — Incubation en atmosphère d'azote . . . . . 428
B. — Incubation en atmosphère d'hydrogène . . . . . 429

V. — *Sensibilisation*. . . . . 429

VI. — *Observations microscopiques* . . . . . 430

A. — Testicules . . . . . 430
B. — Intestin . . . . . 432
C. — Conclusion . . . . . 436

TROISIÈME PARTIE. — ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES ACIDES NUCLÉIQUES

INTRODUCTION . . . . . 438

CHAPITRE PREMIER. — MATÉRIEL ET MÉTHODES . . . . . 439

CHAPITRE II. — RÉSULTATS . . . . . 440

I. — *Étude des ADN* . . . . . 440

A. — Étude de la tête . . . . . 440
1) Embryons témoins irradiés . . . . . 440
2) Embryons protégés . . . . . 444

B. — Étude de l'intestin . . . . . 446
C. — Conclusion . . . . . 448

II. — *Étude des ARN* . . . . . 449

A. — Étude de la tête . . . . . 449
1) Embryons témoins irradiés . . . . . 449
2) Embryons protégés . . . . . 451

B. — Étude de l'intestin . . . . . 451

III. — *Conclusions* . . . . . 452

CONCLUSIONS GÉNÉRALES . . . . . 453

RÉSUMÉ . . . . . 455

BIBLIOGRAPHIE . . . . . 457

## INTRODUCTION

L'action biologique des radiations ionisantes a été étudiée dès la découverte des rayons X par Röntgen et des corps radioactifs par H. Becquerel et M. Curie. Ces travaux ont abouti en 1906 à l'énoncé, par J. Bergonié et L. Tribondeau, des lois qui régissent l'action des rayons X sur la cellule. Ces lois sont les suivantes : « Les rayons X agissent avec d'autant plus d'intensité sur les cellules : 1) que l'activité reproductrice de ces cellules est plus grande ; 2) que leur devenir karyocinétique est plus long ; 3) que leur morphologie et leurs fonctions sont moins définitivement fixées. » On s'est aperçu, par la suite, que ces lois souffraient de nombreuses exceptions et les recherches se sont attachées à compléter les connaissances et à préciser le mode d'action des rayonnements. Diverses théories furent proposées, qui devaient

bientôt laisser place à la théorie de la cible qui rendait bien compte des phénomènes observés jusqu'alors (Crowther J. A., 1924-1926 ; Lacassagne ; Lea, 1946) et qu'on peut résumer ainsi : 1) il existe dans chaque cellule une zone radiosensible appelée cible ; 2) toute ionisation n'est efficace qu'à l'intérieur de la cible ; 3) il faut une ou plusieurs ionisations pour produire un effet.

Cependant, parallèlement aux biologistes, les radiochimistes se sont occupés de la question du mode d'action des radiations ionisantes en phase liquide et ont montré (Risse O., 1929 ; Fricke H., 1934-1938) que, en plus de l'action directe des rayonnements sur les molécules du soluté, il pouvait y avoir une action indirecte des rayons X, par l'intermédiaire du solvant, c'est-à-dire des molécules d'eau ionisées par l'irradiation. J. Weiss (1944) a suggéré que certains radicaux libres, comme le radical hydroxyle, formés par radiolyse de l'eau, étaient responsables de cette action indirecte. A la même époque, Latarjet et Loiseleur (1942) montraient le rôle essentiel de l'oxygène en chimie des radiations et Dale (1940-1943) mettait en évidence le rôle joué par l'eau dans l'irradiation d'enzymes purifiés irradiés aux rayons X en solution aqueuse et montrait que la thiourée pouvait protéger ces enzymes contre l'effet des rayonnements.

Il apparaissait alors clairement que la théorie d'action directe ne suffisait plus à expliquer les phénomènes connus et qu'il fallait y adjoindre un processus d'action indirecte par l'intermédiaire des sous-produits de radiolyse de l'eau. Il semblait possible, de plus, de modifier l'action biologique des rayonnements, en agissant par voie chimique, sur les radicaux libres formés. Il peut paraître étonnant qu'il ait fallu attendre 1949 et les expériences de Patt et coll. et de Herve et Bacq, pour mettre en évidence les premiers radioprotecteurs chimiques *in vivo* et les rechercher systématiquement.

Depuis cette date, ce nouveau chapitre de la radiobiologie a évolué très rapidement et de nombreux travaux sont venus confirmer et développer les premières expériences de radioprotection avec un succès quasi général. C'est ainsi que nous pouvons nous faire actuellement une idée beaucoup plus précise du mode d'action biologique des rayons X, bien que la question soit loin d'être entièrement résolue.

Dans cet ordre d'idées, nous avons pensé que la tératologie expérimentale et la culture organotypique seraient des techniques de choix pour aborder l'étude de quelques phénomènes de radioprotection par une voie nouvelle.

En effet, ces techniques permettent d'observer les réactions d'un organe bien déterminé, indépendamment des réactions complexes qu'un organisme entier peut présenter, soit à la suite d'une irradiation, soit à la suite d'une injection de substance radioprotectrice. D'une part les différents organes d'un embryon de Poulet se développent indépendamment les uns des autres au stade où nous opérons, d'autre part un organe explanté et cultivé, s'il ne se développe pas dans les conditions tout à fait normales, est absolument soustrait à l'influence éventuelle de l'organisme. Enfin, l'embryon irradié localement continue à vivre, et il est possible d'observer les cas de protection partielle.

Si l'injection de la substance radioprotectrice et l'irradiation sont localisées à l'organe considéré, on pourra connaître l'influence des différents radioprotecteurs à l'échelon de l'organe lui-même. Les premiers résultats de cette méthode ont été exposés dans les publications de Ét. Wolff et J.-M. Kirrmann (1954), de J.-M. Kirrmann (1955, 1957, 1959 et 1962) et de J. Goffinet (1956). On trouvera ici un exposé d'ensemble des résultats.

C'est avec beaucoup d'enthousiasme que j'ai abordé l'étude des Sciences de la Vie, sous la direction de mon maître, M. le Professeur Étienne Wolff. Il m'a enseigné, à l'Université de Strasbourg, les éléments de Zoologie et d'Embryologie expérimentale. Il m'a fait l'honneur de m'admettre ensuite dans son laboratoire, de m'offrir un poste d'assistant au Collège de France et de me confier un sujet d'actualité dans le domaine de la Radiobiologie. De jour en jour il m'a initié aux méthodes de recherche des sciences expérimentales, aux techniques particulières à l'embryologie et ne m'a jamais ménagé ses conseils ni ses encouragements. Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'assurance de sa haute et bienveillante compétence et l'équipement moderne de son grand laboratoire. Pour tout cela, je le remercie aujourd'hui très sincèrement. Je tiens aussi à rendre un témoignage de gratitude à tous mes camarades de laboratoire, qui ont contribué, par leur esprit d'équipe, à créer une atmosphère favorable à un travail fructueux.

Je remercie très vivement M. le Professeur Pierre-P. Grassé de s'être intéressé à mon travail et d'avoir bien voulu accepter la présidence de mon jury de thèse.

*PREMIÈRE PARTIE*

## CHAPITRE PREMIER

### I. — HISTORIQUE

L'étude systématique des phénomènes de radioprotection a débuté avec les travaux de Patt et coll. (1949) qui ont découvert le pouvoir radioprotecteur de la cystéine chez le Rat et les travaux de Herve et Bacq (1949) qui ont montré l'effet du cyanure chez la Souris. Cependant, le terrain était préparé depuis de nombreuses années, par les études des radiochimistes sur des solutions aqueuses de corps purs ou d'enzymes d'une part, par un certain nombre d'expériences plus anciennes effectuées sur l'animal, d'autre part.

Le premier cas de radioprotection connu a été relaté par G. Schwarz (1909) qui a remarqué que la suppression de la circulation sanguine par compression mécanique de la peau humaine diminue la radiosensibilité cutanée. En 1921, H. Holthusen a montré que la sensibilité des œufs d'Ascaris est 3 fois plus faible s'ils sont exposés aux rayons X en atmosphère d'azote. J. Jolly a montré en 1924 que les radiolésions du ganglion poplité du Lapin sont presque nulles s'il est irradié en l'absence de toutes ses connexions, puis remis en place. D'après T. C. Evans et coll. (1941) la peau du Rat est beaucoup moins radiosensible à 0,5° C qu'à 30° C. A. Lacassagne (1942) montre que des Souriceaux, mis en état d'asphyxie par un séjour de 10 minutes au frigidaire à 0°, survivent mieux à une irradiation aux rayons X que les témoins. Baclesse F. et Loiseleur J. (1947) ont montré que le glucose atténue la radiodermite et la chute du poil chez le Lapin irradié localement. Latarjet R. et Ephrati E. (1948) montrent que l'inactivation des bactériophages en suspension dans l'eau est prévenue par addition à l'eau de certaines substances comme des sucres, des acides organiques réducteurs et certains acides aminés.

W. M. Dale, d'autre part, avait montré dès 1942 que certaines substances sulfhydrylées comme la thiourée pouvaient protéger des enzymes en solution aqueuse diluée, contre l'inactivation radio-induite.

Après 1949, on assiste à une multiplication rapide du nombre des publications, sur les phénomènes de radioprotection, qui signalent la découverte d'un grand nombre de substances radioprotectrices nouvelles. Les plus importantes sont la cystéamine (Bacq et coll., 1951) et l'aminoéthylisothiuronium (AET) (Doherty D. G., Burnett W. T., 1955). Au cours des différents chapitres de ce travail, nous étudierons plus en détail quelques-uns des radioprotecteurs éprouvés, ou nouveaux, appliqués à l'embryon de Poulet.

On pourra trouver des exposés plus complets sur la question dans les revues récentes de Patt (1960), Alper (1960) et Maisin et Doherty (1960).

### II. — POSITION DU PROBLÈME

Le terme de « Radioprotection » a été très précisément défini par Latarjet et Gray, en 1954, par opposition à celui de « Radioréparation » de la manière suivante : « On appelle *protection* toute diminution d'une

lésion résultant d'un traitement employé avant l'irradiation, et *réparation* le résultat du traitement employé après le commencement de l'irradiation. »

Le travail que nous présentons ici est consacré à l'étude de quelques phénomènes de radioprotection sur une épreuve particulière et bien déterminée. Les travaux, très nombreux, qui ont été entrepris depuis une dizaine d'années pour rechercher de nouvelles substances radioprotectrices ont, en effet, dans la majorité des cas, pris comme épreuve la dose léthale pour une Souris irradiée *in toto*. Cette méthode ne donne pas entière satisfaction, du fait de la complexité des phénomènes qui entrent en jeu après une irradiation totale et de la variété des modes d'action d'une substance injectée par voie intrapéritonéale.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'expérimenter le pouvoir des substances radioprotectrices sur un jeune organe embryonnaire en croissance soit *in vivo*, soit *in vitro*, en utilisant la technique d'irradiation localisée d'Ét. Wolff (1936) d'une part, et la méthode de culture d'Ét. Wolff et K. Haffen (1951) d'autre part.

Le problème se trouve ainsi, au moins théoriquement, simplifié. En effet, l'épreuve ne sera plus la mort de l'animal, mais la survie et la différenciation d'un organe, indépendamment du reste de l'organisme qui continuera à se développer normalement ; les différents territoires d'un jeune embryon se développent, en effet, de façon relativement indépendante les uns des autres. D'autre part, la substance injectée localement n'affectera pas le reste de l'organisme et ne donnera pas lieu à des réactions d'ordre général, car la circulation embryonnaire est très peu importante au stade de l'intervention. On élimine ainsi la plupart des phénomènes parasites dus au métabolisme des substances injectées et aux réactions de l'organisme à l'injection ou à l'irradiation, celles des organes hématopoïétiques en particulier. On se place donc pratiquement à l'échelle cellulaire. Le problème posé est donc celui-ci : *Dans quelle mesure, l'injection d'une substance radioprotectrice peut-elle modifier la survie et la différenciation d'un organe embryonnaire irradié aux rayons X ?*

La réponse à cette question présente un double intérêt :

1° Celui de savoir si les radioprotecteurs généraux sont aussi radioprotecteurs à l'échelle de l'organe, de façon à préciser leur mode d'action.

2° Celui de fournir une méthode utile pour éprouver de nouvelles substances.

Notre choix s'est porté d'une part sur la cyclocéphalie, malformation expérimentale obtenue à volonté chez le Poulet par une irradiation localisée, d'autre part sur la culture organotypique d'intestin et de testicules d'embryons de Poulet de 10 jours d'incubation. Un certain nombre de substances ainsi que l'anoxie et l'hyperoxie ont été expérimentées dans ces conditions, *in vivo* et *in vitro*. Quelques recherches histochimiques sur les acides nucléiques précisent le mode d'action des rayons X et des radioprotecteurs sur les organes considérés.

## III. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les expériences ont été faites sur l'embryon de Poulet de race Leghorn blanche. Les œufs sont ouverts au niveau de l'aire embryonnaire et refermés par une lamelle de mica, lutée à la paraffine, selon la technique d'Ét. Wolff (1936).

### A. — Technique d'irradiation.

#### 1) *Méthode d'irradiations localisées.*

Nous avons employé la technique d'irradiations localisées d'Ét. Wolff (1936) qui consiste à adapter sur la fenêtre du générateur de rayons X un tube en plomb de 5 centimètres de longueur, percé suivant son axe d'un évidement cylindrique de 3 millimètres de diamètre. Ce tube canalise un faisceau de rayons X étroit, dont on peut localiser le point d'impact à l'aide d'un prisme à réflexion totale escamotable (fig. 1). On dispose sur l'embryon un petit écran de plomb, soutenu par une membrane de cellophane et taillé de façon à encadrer l'organe à irradier, dans une feuille de 0,5 mm. d'épaisseur. Le centrage de la localisation est vérifié avant et après l'irradiation, puis l'œuf est refermé et placé en couveuse où il poursuit son développement.

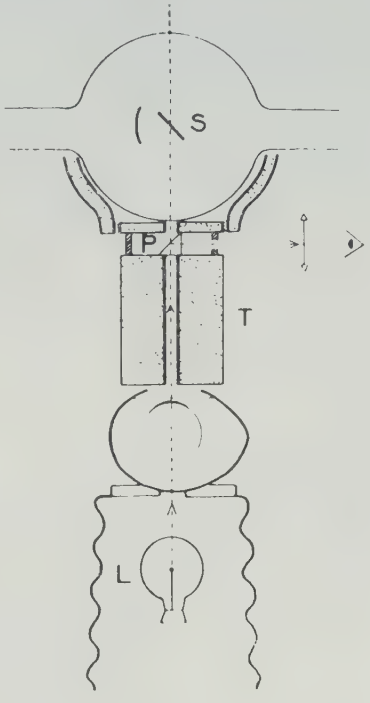



Fig. 1. — Schéma de l'appareil à irradiations localisées. *S* : source de rayons X, *P* : prisme à réflexion totale, *T* : tube localisateur, *L* : lampe d'éclairage.

#### 2) *Caractéristiques du rayonnement.*

Nous avons utilisé le rayonnement X émis par un tube Picker PX2A à anticathode de tungstène de 3,8 mm², travaillant sous 60 kV et 15 mA. La distance au foyer varie de 12 à 13 centimètres. La seule filtration utilisée est la filtration inhérente au tube, elle correspond environ à 5 millimètres d'aluminium. La longueur d'onde minimum du spectre est donnée par la relation $\lambda_0 = \frac{hc}{e\upsilon}$ soit, ici, 0,2 Å ; la longueur d'onde d'intensité maximum est $\lambda_m = 1{,}5\ \lambda_0$ soit, ici, 0,3 Å.

L'énergie du spectre continu est donnée par $I = \int_{\lambda_0}^{\infty} I_\lambda\, d\lambda = kiZV^2$.

Le spectre de raies caractéristiques de tungstène se situe aux longueurs d'onde suivantes : 0,2 ; 0,5 ; 0,9 ; 1 ; 1,3 ; 1,5 Å.

a) *Dosimétrie.*

Toutes les doses sont données en « rœntgens ». La dosimétrie du rayonnement a été faite à l'aide d'une microchambre d'ionisation et d'un électromètre « Dosix » de la C. G. R. Dans les conditions d'utilisation habituelle, la dose à feu nu est donnée en rœntgens par minute, en fonction de la distance ($x$) par la relation :

$$\mathrm{Dr/m} = \frac{2.10^5}{x^2 \mathrm{cm.}} \text{ soit } 1.200 \text{ r/m à } 13 \text{ centimètres.}$$

b) *Champ.*

Quelques mesures ont été faites de part et d'autre du rayon central de façon à déterminer l'étendue du champ constant. La décroissance d'intensité est donnée

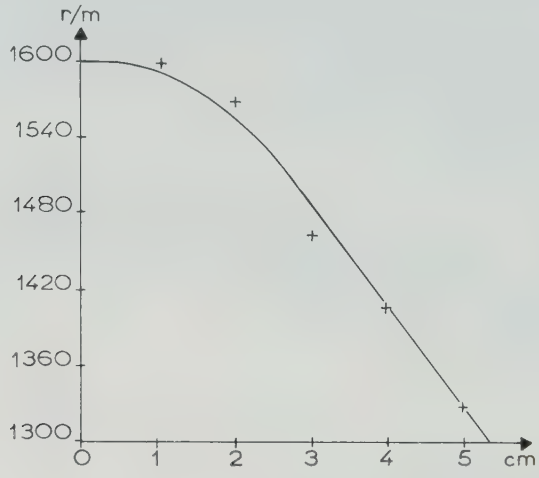



Fig. 2. — Courbe d'intensité du rayonnement en fonction de la distance au rayon central.

par la figure 2. On voit que sur un diamètre de 3 centimètres environ à 13 centimètres du foyer, la variation d'intensité ne dépasse pas 1 à 2 0/0. Un faisceau de 3 millimètres de diamètre est donc très homogène.

c) *Absorption par la matière.*

L'épaisseur demi-absorbante a été mesurée pour l'eau et pour l'aluminium. On a trouvé 1,35 mm. pour l'aluminium et 10 millimètres pour l'eau. On voit qu'il faut environ 1 centimètre de tissu mou pour absorber la moitié de l'énergie incidente. Les organes embryonnaires irradiés ne mesurant que 1 à 2 millimètres environ d'épaisseur, on peut considérer la dose comme homogène dans toute l'épaisseur de l'organe.

d) *Influence du localiseur sur la dose.*

L'interposition du cylindre localiseur entre la source et la cible modifie légèrement la dosimétrie, en faisant perdre une partie de sa puissance au faisceau incident. Une série d'expériences de tératologie nous a permis de montrer que la perte est de l'ordre de 30 0/0. Les doses indiquées ci-dessus, toutes mesurées à feu nu, devront donc être affectées du coefficient 0,7 chaque fois qu'il sera fait d'usage du localiseur.

e) *Précision des mesures.*

La dose D émise par la source est proportionnelle à l'intensité du courant passant dans le tube générateur, au carré de la tension appliquée, au temps et inversement proportionnelle au carré de la distance. De la précision avec laquelle sont mesurées ces grandeurs dépend l'identité des doses utilisées pour chaque expérience. Un rapide calcul d'erreur nous donnera l'ordre de précision qui correspond à nos conditions expérimentales.

On a :

$$D = \frac{K i V^2 t}{x^2}$$

et en prenant la différentielle logarithmique :

$$\frac{\Delta D}{D} = \frac{\Delta I}{I} + 2\frac{\Delta V}{V} + \frac{\Delta t}{t} + 2\frac{\Delta x}{x}.$$

Le voltage étant donné par un transformateur à plots et le temps par un chronomètre incorporé ; nous pouvons considérer $\Delta V$ et $\Delta t$ comme nuls. L'intensité est lue sur un milliampèremètre de précision où l'on peut apprécier le cinquième de mA, la mesure de la distance sera donc la principale source d'erreur puisque, suivant les œufs, la hauteur entre la fenêtre et l'embryon peut subir des variations allant jusqu'à 5 millimètres.

Nous avons donc :

$$\frac{\Delta D}{D} = \frac{0{,}2}{15} + 2\frac{0{,}5}{13} = \frac{9}{100}.$$

Les doses données pour chaque type d'expérience seront donc indiquées avec une précision de l'ordre de 10 0/0.

## B. — La cyclocéphalie.

La cyclocéphalie est une malformation obtenue expérimentalement par Ét. Wolff (1934) par irradiation, au stade 12 à 25 somites, de l'ébauche

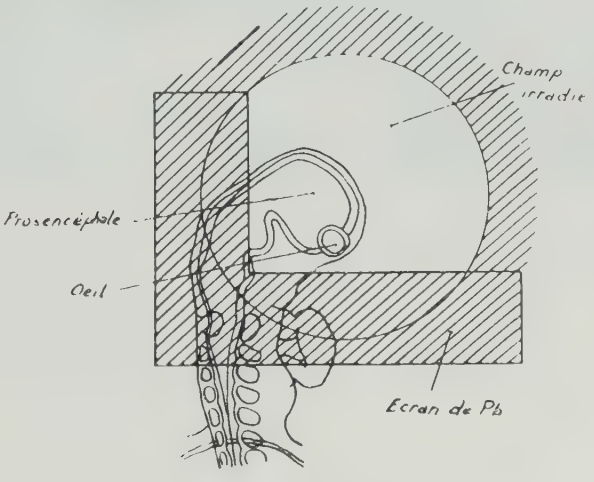



Fig. 3. — Schéma de localisation de l'irradiation sur un embryon de 18 somites.

du prosencéphale et des vésicules optiques d'un embryon de Poulet. Un petit écran de plomb en forme d'équerre est disposé sur l'embryon comme l'indique la figure 3. On voit sur la figure 4 l'image radiographique du champ irradié.

Une petite partie de l'aire vasculaire est détruite, mais régénère très rapidement. Si l'on observe, au 10e jour de l'incubation un embryon ainsi traité, on remarque l'absence complète de bec supérieur, le bourgeon

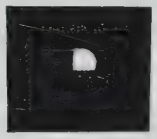


Fig. 4. — Image radiographique du champ irradié (grandeur nature).

frontal ne s'est pas développé, les bourgeons maxillaires supérieurs s'unissent pour fermer la cavité buccale, le bec inférieur et la langue sont normaux. Le télencéphale et les yeux sont complètement absents, les orifices auditifs sont venus se placer à l'endroit occupé normalement par les yeux (fig. 5). L'anophtalmie est ici une malformation accessoire,

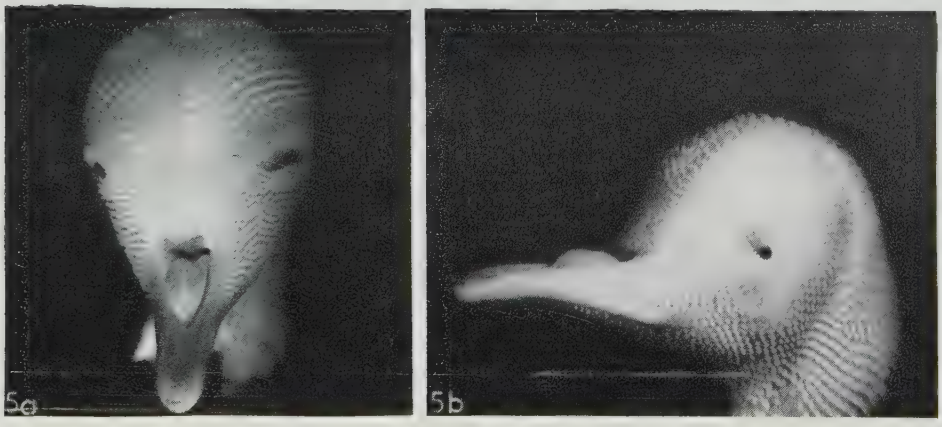



Fig. 5. — Tête d'embryon cyclocéphale anophtalme au 10e jour de l'incubation. *A*, de face ; *B*, de profil (× 4).

obtenue en plus de la cyclocéphalie (absence du bourgeon frontal). Les 2 malformations seront, en général, dénombrées séparément.

Au cours des expériences de radioprotection, tous les embryons ont été autopsiés au 10e jour de l'incubation, stade auquel la malformation se reconnaît très facilement. Cependant, les embryons morts entre le 6e et le 10e jour ont aussi été comptés, car la malformation peut s'y reconnaître. Les embryons morts avant le 6e jour ont été comptés comme « morts ».

*Fréquence de malformations en fonction de la dose.*

Dans la statistique ci-dessous, seuls sont comptés comme cyclocéphales anophtalmes, les embryons qui présentent une absence *complète* du télencéphale, du bourgeon frontal et des yeux. De même, ne sont comptés comme anophtalmes que ceux qui présentent une absence *complète* des 2 yeux.

TABLEAU I

*Pourcentage de malformations obtenu en fonction de la dose de rayons X.*

| Dose d'irradiation . | 2.000 r | 3.000 r | 4.000 r | 5.000 r | 6.000 r | 7.500 r |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes . . . . | 0 0/0 | $\frac{49}{80}$ = 61 0/0 | $\frac{63}{78}$ = 81 0/0 | $\frac{198}{208}$ = 95 0/0 | $\frac{28}{28}$ = 100 0/0 | $\frac{34}{34}$ = 100 0/0 |
| Anophtalmes . . . | 0 0/0 | $\frac{57}{80}$ = 71 0/0 | $\frac{66}{78}$ = 85 0/0 | $\frac{202}{208}$ = 97 0/0 | $\frac{28}{28}$ = 100 0/0 | $\frac{34}{34}$ = 100 0/0 |

On voit qu'à partir de 5.000 r nous avons 95 0/0 de cyclocéphales anophtalmes et 97 0/0 d'anophtalmes. Cette dose sera choisie comme dose-test et utilisée de façon systématique dans les expériences de radioprotection. On remarque aussi que, pour chaque dosage, l'anophtalmie est légèrement plus fréquente que la cyclocéphalie, l'ébauche oculaire est légèrement plus sensible que le bourgeon frontal.

### C. — Technique d'injection.

Toutes les substances utilisées ont été injectées en solution aqueuse à l'aide du micro-injecteur d'Ancel (P. ANCEL et J. HOUGET, 1954).

#### 1) *Microinjecteur d'Ancel.*

L'appareil (fig. 6) est constitué par une seringue hypodermique 1/4 de centimètre cube montée sur un support horizontal ; le piston de la seringue est enfoncé par une vis micrométrique graduée en 1/100 de millimètre. D'autre part, une aiguille fine, en verre, est montée et articulée sur un autre support ; on peut la déplacer verticalement grâce à une

vis. La seringue est reliée à l'aiguille par un fin conduit souple en nylon.

Cet appareil est capable d'injecter une quantité minimum de 0,07 mm³ de solution, pour une course de piston de 1/100 de millimètre.

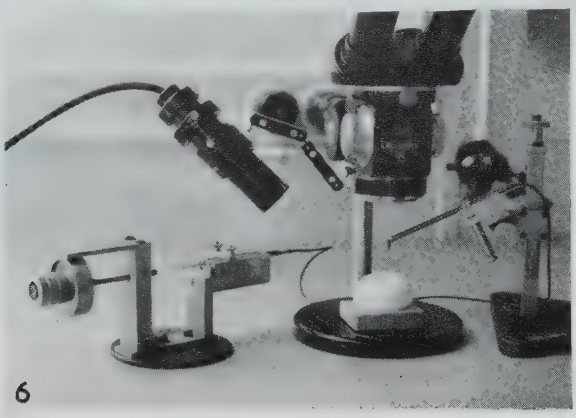



Fig. 6. — Dispositif de microinjection d'Ancel et Houget.

2) *Mode d'injection.*

L'injection est pratiquée de la manière suivante :

L'œuf étant ouvert de la manière habituelle après 48 heures d'incubation, on déchire, sous la loupe binoculaire, la membrane vitelline dans la région céphalique de l'embryon, ainsi que le repli céphalique s'il y a lieu. L'aiguille du micro-injecteur est ensuite amenée au contact de la tête de l'embryon, de façon que sa pointe soit au niveau de la face inférieure de la tête. On actionne alors le piston jusqu'à ce que la solution baigne toute la tête. Si l'on emploie une solution colorée, on remarque que la quantité nécessaire et suffisante pour que la partie céphalique soit bien imprégnée, est de 1,4 mm³. C'est donc cette quantité qui sera injectée dans les expériences de radioprotection, et c'est en faisant varier les concentrations que nous avons fait varier les quantités de substance injectée.

La méthode consiste à essayer d'abord des concentrations choisies pour encadrer tout de suite la dose toxique, soient des concentrations en poids de $\frac{1}{p}$ et $\frac{1}{q}$. On essaye ensuite la concentration intermédiaire $\frac{1}{h}$ telle que $\frac{2}{h} = \frac{1}{p} + \frac{1}{q}$ (moyenne harmonique) et ainsi de suite jusqu'à ce que l'on obtienne la concentration maximum utilisable.

### D. — Technique d'incubation en atmosphère gazeuse.

#### 1) *Description de l'appareil.*

Une baignoire spéciale en verre, avec un couvercle de plexiglass a été construite selon le schéma de la figure 7, pour irradier les œufs en atmosphère gazeuse définie. Ce récipient peut contenir 3 œufs en ligne qui seront irradiés successivement ; il est muni à l'entrée et à la sortie d'un robinet

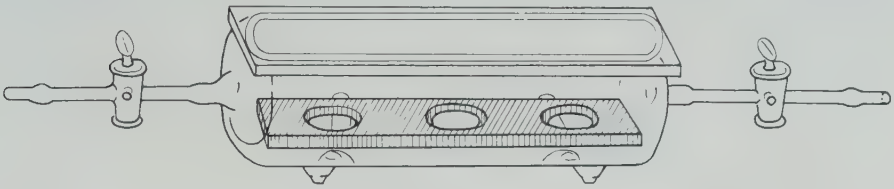


Fig. 7. — Schéma de la baignoire à irradiations en atmosphère gazeuse.

étanche et d'un flacon laveur jouant le rôle de soupape et de contrôleur de débit. Le couvercle de plexiglass est luté à la vaseline sur le rodage du verre.

#### 2) *Contrôle du débit gazeux.*

Pour un volume d'environ 1 litre de la baignoire, à quoi il faut ajouter les volumes d'un flacon laveur d'environ 250 $cm^3$ et des tuyauteries, le débit gazeux a été réglé à 1 litre à la minute. On compte en général qu'il faut laver 20 fois le volume du récipient pour déplacer tout le gaz, ce qui correspond dans notre cas à 30 minutes de barbotage. Pour être dans de bonnes conditions de sécurité, nous avons laissé barboter le gaz systématiquement pendant 1 heure. Nous avons utilisé des bombes commerciales d'hydrogène, d'azote et de $CO_2$ destinées à déplacer l'oxygène de l'air. Cette méthode ne réalise pas une anoxie complète, puisqu'aussi bien l'œuf contient une réserve d'$O_2$, mais une hypoxie très importante et tout à fait suffisante pour les résultats que nous attendions.

#### 3) *Absorption du couvercle de plexiglass.*

Des mesures au dosimètre ont montré que le couvercle de plexiglass, à travers lequel est faite l'irradiation, absorbe environ 16 0/0 du rayonnement. Les conditions d'irradiation ont donc été modifiées en conséquence, de façon que l'embryon soit soumis à la dose habituelle.

## E. — Méthodologie.

Comme nous l'avons vu, une certaine irradiation localisée conduit à une certaine proportion d'embryons cyclocéphales. Cette proportion dépend de la dose et si l'on trace la courbe donnant la proportion de cyclocéphales en fonction de la dose, on obtient une courbe d'allure sigmoïde (fig. 8).

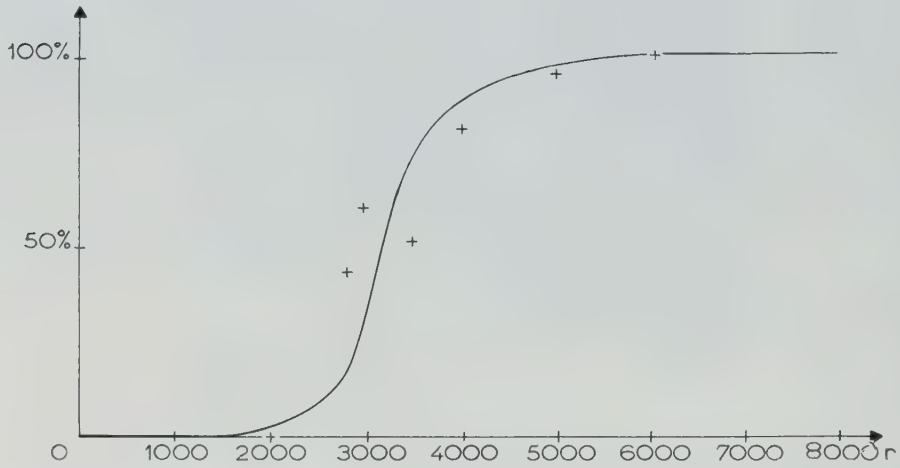



Fig. 8. — Courbe de fréquence de cyclocéphalie en fonction de la dose de rayonnement.

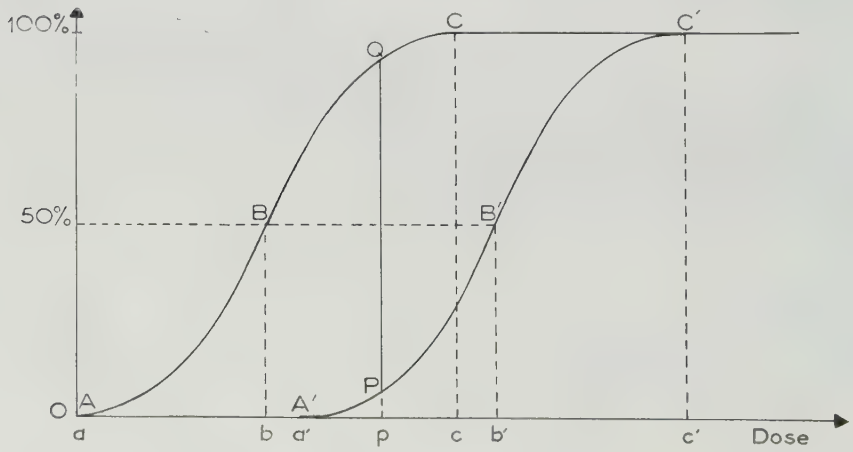



Fig. 9. — Courbes théoriques de fréquence de cyclocéphalie en fonction de la dose de rayonnement chez les témoins *(ABC)* et les protégés *(A'B'C')*.

Cette courbe représente la fréquence de survie du bourgeon frontal en fonction de la dose de rayons X. Que pouvons-nous espérer après protection ? Si elle ne fait que modifier la dose de rayons X active, nous obtiendrons un déplacement de la courbe vers la droite, parallèlement à elle-même (fig. 9).

Théoriquement, le rapport des abscisses $\frac{Ob'}{Ob}$ représente le rapport des doses donnant le même effet biologique dans les 2 cas et mesure le facteur de réduction de dose (F. R. D.) caractéristique du radioprotecteur utilisé.

Dans la pratique, il est plus aisé de mesurer la différence de proportion de cyclocéphalie obtenue pour une même dose de rayons X dans les 2 cas, c'est-à-dire la longueur d'un axe d'ordonnée PQ comprise entre les 2 courbes. Quelle sera alors la dose d'irradiation que l'on devra choisir pour que ce segment soit le plus long possible ?

1) $a' \geqslant c$.

Dans ce cas, une irradiation qui donne 100 0/0 de cyclocéphales chez les témoins, en donne 0 0/0 chez les protégés. On aura donc intérêt à utiliser la dose minimum donnant 100 0/0 de cyclopes chez les témoins, soit la dose $c$.

2) $a' < c$.

Dans ce cas, les embryons ne seront pas tous protégés pour la dose $c$ et l'on peut se demander quelle dose, comprise entre $a$ et $c$, donnera la plus grande différence. Un calcul simple montre que cette dose est égale à $\frac{b + b'}{2}$.

Il en résulte que dans le cas d'un radioprotecteur faible, on aura intérêt à choisir une dose légèrement inférieure à celle qui donne 100 0/0 de cyclocéphales, alors que la méthode du tout ou rien sera la meilleure pour un radioprotecteur plus efficace.

Dans la pratique, nous avons toujours commencé l'étude d'un radioprotecteur avec la dose $c$ et ce n'est que dans le cas de résultats douteux que nous avons essayé des doses plus faibles.

## F. — Notion de quantité de protection.

La quantité de protection apportée par une substance est en général mesurée par le facteur de réduction de dose, c'est-à-dire le rapport des doses qui donneront le même effet avec et sans substance radioprotectrice. Notre méthode se prête mal à la mesure d'un tel rapport : nous mesurons en fait le pourcentage $p$ 0/0 d'embryons ayant échappé à la monstruosité *complète*, cela ne veut pas dire que le corps soit radioprotecteur à $p$ 0/0, mais à $q$ 0/0 $< p$ 0/0 car tous les embryons protégés ne sont pas normaux. Cependant, il en résulte que notre méthode est plus sensible et pourra mettre en évidence des phénomènes de radioprotection faible.

## G. — Résumé et processus expérimental pratique.

Pratiquement, chaque série expérimentale sera conduite de la manière suivante :

1) Une série d'embryons témoins subit une irradiation localisée destinée à les rendre cyclocéphales anophtalmes dans une certaine proportion $p$ (cette proportion est en général choisie à 95 ou 100 0/0).

2) Une autre série d'embryons subit, avant une telle irradiation, une injection de substance radioprotectrice ou une incubation en atmosphère gazeuse définie ; et on dénombre, au 10e jour de l'incubation, une proportion $q$ de cyclocéphales anophtalmes.

3) Si $q$ est significativement inférieur à $p$, on conclut que le produit utilisé est radioprotecteur dans les conditions de l'expérience.

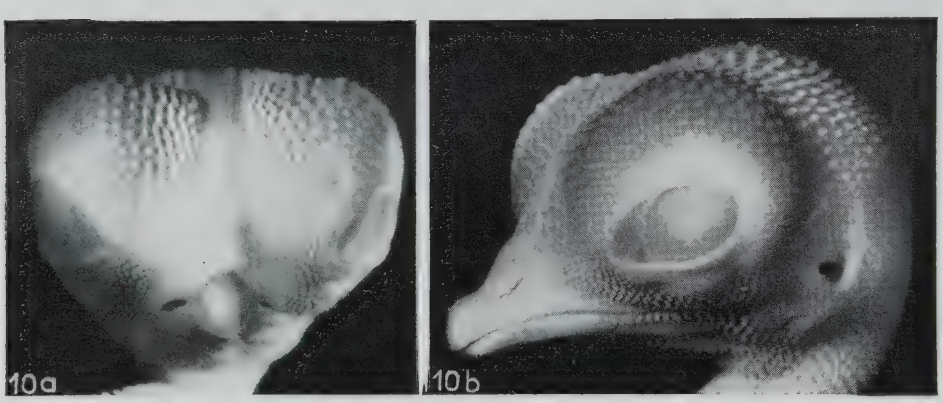



Fig. 10. — Tête d'embryon normal au 10e jour de l'incubation. *A*, de face ; *B*, de profil (× 4).

Dans le dépouillement des résultats, on trouve en fait, tous les intermédiaires entre le cyclocéphale (fig. 5) et le normal (fig. 10). Ces différents types de monstruosités sont classés de la manière suivante :

TABLEAU II

*Classification des malformations* (voir fig. 11 à 18).

| Cyclocéphalie | Anophtalmie |
|---|---|
| Absence de bec supérieur et de télencéphale. | Absence totale des deux yeux. |
| Bec supérieur et télencéphale réduits. | Présence de 2 yeux réduits : microphtalmie bilatérale. |
| Bec supérieur et télencéphale normaux. | Présence d'un seul œil réduit : microphtalmie unilatérale. |
| | Présence d'un seul œil normal : monophtalmie. |
| | Présence de 2 yeux normaux. |

Fig. 11.

Fig. 12.

Fig. 11. — Tête d'embryon protégé par une injection de 8-oxyquinoline et irradié à 5.000 r. Réduction du bec supérieur et anophtalmie (× 4).

Fig. 12. — Tête d'embryon protégé par une injection de diéthyldithiocarbamate de sodium et irradié à 5.000 r. Bec supérieur presque normal, anophtalmie (× 4).

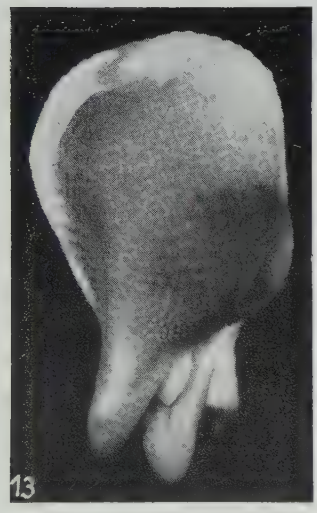



Fig. 13.

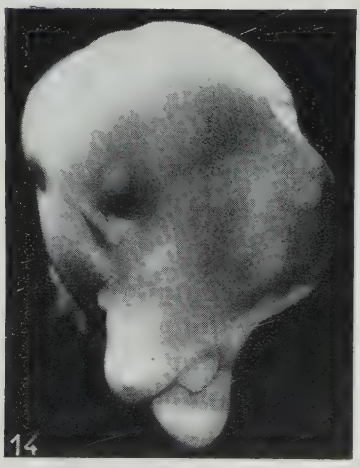



Fig. 14.

Fig. 13. — Tête d'embryon protégé par une injection de cystéamine et irradié à 5.000 r. Bec supérieur normal, monophtalmie gauche (× 4).

Fig. 14. — Tête d'embryon protégé par une injection de bleu de méthylène et irradié à 5.000 r. Bec supérieur et œil gauche normaux, œil droit réduit (×4).

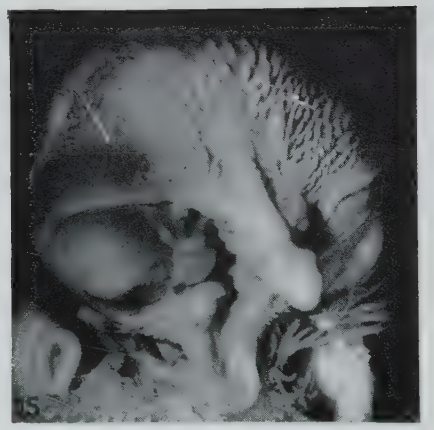
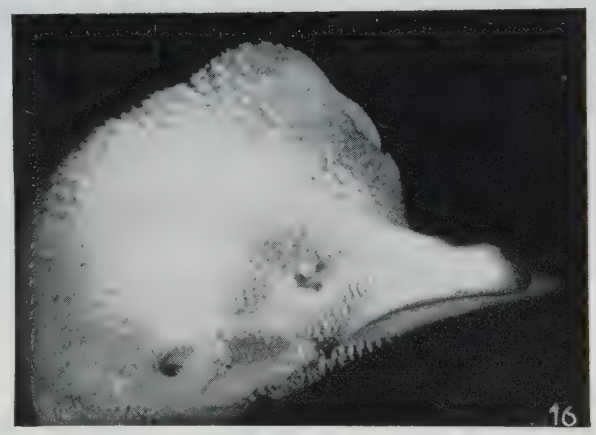
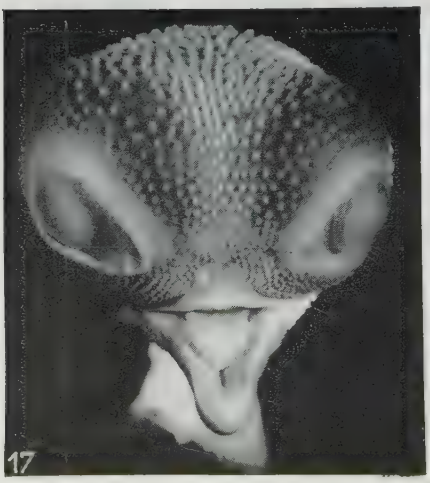


Fig. 15. — Tête d'embryon soumis à une injection simple de bleu de méthylène, sans irradiation. Absence complète des deux bourgeons maxillaires supérieurs (× 4).

Fig. 16. — Tête d'embryon protégé par une incubation en atmosphère d'azote et irradié à 5.000 r. Bec supérieur et œil gauche normaux. Œil droit absent (× 4).





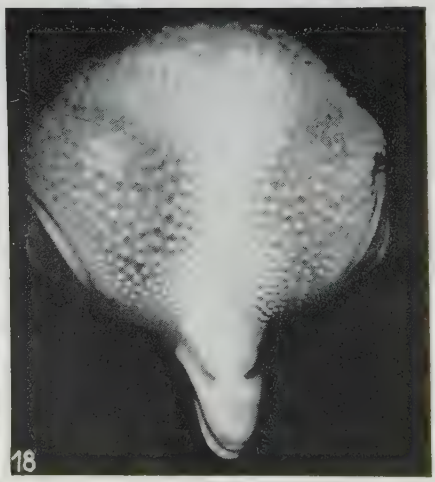


Fig. 17.

Fig. 18.

Fig. 17. — Tête d'embryon protégé par une incubation en atmosphère d'hydrogène et irradié à 5.000 r. Deux yeux normaux, bec supérieur absent (× 4).

Fig. 18. — Tête d'embryon protégé par une incubation en atmosphère d'hydrogène et irradié à 5.000 r. Aspect normal (× 4).

# CHAPITRE II

# RADIOPROTECTION *IN VIVO*

## I. — La cystéamine.

### A. — Introduction.

Le pouvoir radioprotecteur de la cystéamine ($SH — CH_2 — CH_2 — NH_2$ ou MEA) a été découvert en 1951 par Bacq et ses collaborateurs, qui ont montré que ce corps, injecté par voie intrapéritonéale, réduit de 97 0/0 à 7 0/0 la mortalité de Souris soumises à une irradiation totale de 700 r. Depuis, de nombreux travaux ont confirmé et étendu les premiers résultats de Bacq. La cystéamine s'est révélée être un radioprotecteur presque universel. Elle est efficace chez le Rat (Bacq, 1956) en irradiation totale, elle évite l'épilation radio-induite chez le Souriceau (Radivojevic et coll., 1960). Elle est efficace chez le Singe (Crouch, Overmann, 1957). Elle protège les cellules vaginales du Rat irradiées localement (Darcis et coll., 1956). Elle protège les testicules de Souris contre 600 r (Desaive et coll., 1953) et évite la stérilisation des ovaires de Lapines irradiées à 2.500 r (Desaive, 1954). Elle protège *E. coli* contre 60.000 r (Hollaender et coll., 1954). Elle ne protège pas contre les effets mutagènes des radiations chez la drosophile et la Souris (Kaplan et coll., 1953). Cette opinion est contestée par Lüning, Frölen et Nelson (1961). Elle protège l'intestin de Souris (Latarjet et coll., 1961) et l'embryon de Rat irradié *in utero* (300 r) (Maisin et coll., 1955). Elle protège la tumeur de Caspari (adénocarcinome mammaire) greffée sur la Souris (Neukomm et coll., 1954). Elle augmente le temps de survie du têtard de Grenouille (Rugh, 1954) et du fœtus de Souris (Rugh et coll., 1956) après irradiation. Elle diminue la fréquence de malformations chez les jeunes Souris irradiées à 300 r au 12e jour de la gestation (Woollam et coll., 1958). Nous avons montré (Wolff et Kirrmann, 1954 ; J.-M. Kirrmann, 1955) qu'elle protège également l'embryon de Poulet contre l'action tératogène des rayons X.

### B. — Influence de la cystéamine sur la production expérimentale de Poulets cyclocéphales par irradiations localisées.

Nous avons cherché à mesurer le pouvoir radioprotecteur de la cystéamine au moyen de la méthode indiquée au chapitre précédent. Nous avons utilisé la cystéamine cristallisée livrée par Fluka. On sait que c'est un produit instable et difficile à conserver, facilement oxydable et à toxicité variable (Bacq, 1956-1959). Nous avons utilisé pour chaque expérience, une solution fraîche, préparée immédiatement avant l'emploi, dans de l'eau distillée fraîchement bouillie.

#### 1) *Injection de cystéamine.*

Une première série d'expériences a consisté à injecter la cystéamine en solution aqueuse à des concentrations variables, afin de déterminer la dose maximum supportable pour l'embryon. La quantité injectée ne

varie pas, elle correspond à la quantité de liquide nécessaire pour baigner toute la tête, soit 1,4 mm³.

*Solution à 1/100, soit 14 γ par embryon*, soit $\frac{M}{7,7}$.

Quelques minutes après une telle injection, on voit se contracter et se plisser la partie de l'aire vasculaire située au voisinage immédiat de la tête, la circulation s'arrête dans les capillaires, on observe quelques hémorragies, et les embryons meurent en quelques heures par arrêt du cœur. Sur 11 embryons ainsi traités, un seul a survécu ; à 12 jours il n'avait pas d'yeux, était cœlosomien et avait un cerveau atrophié.

*Solution à 1/200, soit 7 γ par embryon*, soit $\frac{M}{15,4}$.

Les symptômes sont à peu près semblables, mais atténués, et un certain nombre d'embryons rétablissent leur circulation en quelques heures et continuent leur développement. On observe cependant quelques malformations céphaliques chez les survivants. Sur 25 embryons ainsi traités, 14 sont normaux, 3 présentent une absence de l'œil droit, et du bourgeon maxillaire supérieur droit, et 8 sont morts.

*Solution à 1/400, soit 3,5 γ par embryon*, soit $\frac{M}{30,8}$.

Dans ce cas, on n'observe plus d'arrêt circulatoire, mais simplement quelques îlots sanguins qui semblent figés autour de la tête. La mortalité est relativement faible (8/33) et il n'y a pas de malformation.

Des concentrations plus faibles n'ont aucun effet. La dose expérimentale a donc été fixée à une concentration de 1/400, soit $\frac{M}{30,8}$.

TABLEAU III

*Fréquence de malformation et de mortalité après injection de cystéamine.*

| Cystéamine en solution à | 1/100 | 1/200 | 1/400 |
|---|---|---|---|
| Normaux | 0 | 14 | 25 |
| Malformés | 1 | 3 | 0 |
| Morts | 10 | 8 | 8 |

### 2) *Expériences de protection à la cystéamine.*

Les expériences ont été faites dans les conditions précisées ci-dessus, et ont donné les résultats suivants.

L'irradiation (5.000 r) était pratiquée 4 heures après l'injection de cystéamine.

TABLEAU IV

*Résultats des expériences de protection à la cystéamine.*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes | | | 2 |
| Petit bec supérieur, anophtalmie | | 6 | |
| Petit bec supérieur, microphtalmie bilatérale | 4 | | |
| Petit bec supérieur, monophtalmie droite | 1 | | |
| Bec supérieur normal, microphtalmie bilatérale | 3 | 23 | 29 |
| Bec supérieur normal, monophtalmie gauche | 13 | | |
| Normal | 2 | | |
| Morts | | | 20 |

Fréquence de la cyclocéphalie $\frac{2}{31} = 6\ 0/0$ $\quad p < 0{,}005.$

Fréquence de l'anophtalmie $\frac{8}{31} = 26\ 0/0$ $\quad p < 0{,}005.$

On voit que sur 51 embryons, 20 sont morts, 2 sont devenus cyclocéphales et 29 ont été protégés. On obtient donc une protection de 94 0/0 des embryons, alors que 95 0/0 des embryons sont cyclocéphales chez les témoins. Cependant, la qualité de la protection peut varier suivant les cas et on observe tous les intermédiaires entre le normal et le cyclocéphale anophtalme typique.

Si l'on considère seulement l'anophtalmie, les résultats sont les suivants : sur 31 embryons, 8 sont anophtalmes et 23 présentent au moins 1 œil, plus ou moins développé, on a donc une protection de 74 0/0 des embryons traités, alors que 97 0/0 des embryons sont anophtalmes chez les témoins. On voit que l'œil est moins bien protégé en général que le bourgeon frontal. Ceci tient au fait que l'œil est légèrement plus radiosensible que le reste de la tête.

On remarque d'autre part que lorsqu'un seul œil est conservé, c'est le plus souvent (13 fois sur 14) l'œil gauche. Ceci tient au fait qu'au moment de l'irradiation, la tête de l'embryon est, dans certains cas, tournée sur le côté gauche et présente sa face droite vers le faisceau de rayons X. Par conséquent, la dose de rayonnement est légèrement plus faible au niveau de l'œil gauche (On peut expliquer le cas de meilleure protection de l'œil droit par une différence de répartition de la cystéamine au moment de l'irradiation).

### 3) *Expériences complémentaires.*

a) *Injections après l'irradiation.*

Si l'injection de cystéamine est faite immédiatement après l'irradiation, les autres conditions expérimentales étant les mêmes que ci-dessus, nous n'obtenons plus aucune différence avec les témoins, puisque sur 16 embryons ainsi traités, 15 sont devenus cyclocéphales anophtalmes. Il s'agit donc bien d'un phénomène de radioprotection, non de réparation, puisque la cystéamine n'est efficace que si elle est présente dans la cellule au moment de l'irradiation.

b) *Injections sur la région caudale.*

Quelques expériences d'injections localisées à la région caudale, 4 heures avant une irradiation de la tête, ont montré que la cystéamine agit bien localement, et non par une réaction sur un autre organe plus ou moins éloigné. En effet, il n'y a aucune protection dans ce cas, sur 15 embryons traités, 15 sont devenus cyclocéphales.

### 4) *Conclusions.*

De ce chapitre, nous pouvons conclure que la cystéamine est un bon radioprotecteur chez l'embryon de Poulet. Elle protège 94 0/0 de embryons irradiés, contre la cyclocéphalie. Cette malformation apparaît dans 95 0/0 des cas chez les témoins. La cystéamine est un radioprotecteur vrai, puisqu'elle est inefficace après l'irradiation, elle semble d'autre part agir localement, puisque elle est inefficace si elle est injectée sur une autre partie de l'embryon.

## II. — Le bleu de méthylène.

### A. — Introduction.

On pouvait se demander quel était le facteur le plus important du point de vue de la radioprotection, parmi les différentes fonctions chimiques et propriétés biologiques de la cystéamine. Peut-on penser que son pouvoir réducteur joue un rôle important, ou bien faut-il penser à une autre fonction ? Le fait que d'autres radioprotecteurs connus sont aussi des réducteurs, nous a incité à rechercher si un agent d'oxydo-réduction puissant, comme le bleu de méthylène, pouvait avoir une influence sur la radiosensibilité embryonnaire dans les mêmes conditions expérimentales que ci-dessus.

Nous avons donc fait une série d'expériences en employant systématiquement le bleu de méthylène soit à l'état oxydé soit à l'état de leucodérivé, avec la même malformation expérimentale comme épreuve.

### B. — Effet du bleu de méthylène seul.

La quantité de solution injectée a été la même que dans le cas de la cystéamine. Il est très facile de voir, puisqu'il s'agit d'un produit intensément coloré, la répartition de la solution autour de la tête ; il y a très peu de dispersion, la solution reste bien en place, seuls quelques minces filets coulent le long du corps. Le colorant semble se fixer sélectivement sur les yeux et le système nerveux. Nous avons fait varier les concentrations de la façon suivante :

1) *Solution à 1/100*, soit $\frac{M}{37,39}$.

Sur 14 embryons traités, 12 sont morts avant 8 jours, les 2 autres étaient normaux au 10e jour de l'incubation. Cette concentration est donc hautement toxique.

2) *Solution à 1/200*, soit $\frac{M}{74,78}$.

Sur 52 embryons traités, 27 sont morts, 13 sont normaux et 12 présentent des malformations caractéristiques qui se répartissent ainsi :

Tableau V

*Malformations obtenues après injection de bleu de méthylène (M/74,78).*

| | |
|---|---|
| — Bourgeons maxillaires supérieurs non soudés<br>— Double colobome rétinien, œil gauche réduit<br>— Cœlosomie | 1 |
| — Malformations du cerveau | 6 |
| — Malformations du cerveau<br>— Absence de la paupière droite | 1 |
| — Double bec de lièvre complet, bourgeons maxillaires supérieurs non soudés au bourgeon frontal (fig. 15)<br>— 2 yeux normaux placés en bordure de la cavité buccale | 3 |
| — Œil droit réduit | 1 |

On voit qu'à cette concentration, le bleu de méthylène est encore assez toxique, puisqu'environ la moitié (27/52) des embryons meurent dans les premiers jours, et que d'autre part, parmi les embryons qui survivent, à peu près la moitié (12/25) présentent certaines malformations.

Il est remarquable que, à côté des malformations banales ou accidentelles comme des aberrations du cerveau ou la cœlosomie, on obtienne

l'absence de soudure des bourgeons maxillaires supérieurs au bourgeon frontal dans 4 cas sur 25, alors que les autres bourgeons faciaux ne sont jamais touchés. Il semble y avoir là une action spécifique du bleu de méthylène. Il est possible que cet effet soit dû à une anoxie relative à un stade critique, en effet, Ingalls (1950) a obtenu des fissures palatines par anoxie chez la Souris.

Il est important, dans notre cas, de constater que le bourgeon frontal et les yeux ne sont jamais absents. Cette concentration, bien qu'elle donne une assez forte mortalité, pourra cependant être utilisée pour un test de radioprotection.

3) *Solution à 1/1.000*, soit $\frac{M}{373,9}$.

Sur 22 embryons traités, 8 sont morts avant le 8e jour, 10 sont normaux, et 4 présentent quelques malformations peu importantes, décrites dans le tableau ci-dessous.

Tableau VI

*Malformations obtenues après injection de bleu de méthylène* (M/373,9).

| | |
|---|---|
| Pas de paupière droite . . . Prosencéphale réduit. . . . | 1 |
| Double bec-de-lièvre . . . . Yeux légèrement réduits. . . | 1 |
| — Yeux réduits . . . . . | 1 |
| — Double bec-de-lièvre . . . . | 1 |

On voit que cette concentration donne une mortalité d'environ 1/3 des embryons traités (8/22) et relativement peu de malformations (4 sur 14). Nous voyons toutefois réapparaître ici 2 cas de double bec-de-lièvre, par défaut de soudure des bourgeons faciaux supérieurs. Cette concentration sera considérée comme la dose expérimentale de bleu de méthylène dans les essais de radioprotection.

### C. — Pouvoir radioprotecteur du bleu de méthylène.

Par une méthode identique à celle employée pour la cystéamine, nous avons essayé le bleu de méthylène comme radioprotecteur vis-à-vis de la cyclocéphalie chez l'embryon de Poulet.

L'irradiation tératogène était pratiquée 1 heures après l'injection de la solution de bleu.

1) *Solution à 1/200.*

Sur 31 embryons traités par une solution de bleu de méthylène à 1/200 et irradiés 4 heures après, 16 sont morts et 15 sont devenus cyclocéphales anophtalmes. On n'observe donc aucun phénomène de radioprotection.

2) *Solution à 1/1.000.*

Sur 20 embryons traités par une solution à 1/1.000, 8 sont morts et 12 sont devenus cyclocéphales anophtalmes, le résultat est le même que ci-dessus.

Employé dans ces conditions, le bleu de méthylène est donc totalement inefficace. Nous allons voir qu'il n'en sera pas de même avec le leucodérivé.

### D. — Essais de réduction du bleu de méthylène.

Étant ainsi assuré que le bleu de méthylène était absolument inefficace à l'état oxydé, nous avons entrepris de rechercher l'effet de son leucodérivé. Plusieurs méthodes ont été envisagées pour obtenir le leucodérivé :

1° Réduction par l'hydrogène ;
2° Réduction par l'embryon lui-même ;
3° Réduction par le jus d'embryon ;
4° Réduction par un organe cultivé.

#### 1) *Réduction du bleu de méthylène par l'hydrogène.*

Il est très facile d'obtenir une solution de leucodérivé, en faisant barboter un courant d'hydrogène dans la solution de bleu en présence de noir de platine. On obtient en quelques minutes une solution parfaitement incolore. Malheureusement, dès que la solution est remise au contact de l'air, elle s'oxyde très rapidement et reprend sa teinte originale en quelques secondes. Il est impossible, par conséquent, d'injecter une solution de leucodérivé directement à l'embryon et nous avons dû renoncer à cette méthode.

#### 2) *Réduction du bleu de méthylène par l'embryon lui-même.*

Si l'on observe l'évolution d'un embryon ayant reçu une injection de bleu de méthylène, on remarque au bout de 2 ou 3 heures, que la partie céphalique est devenue uniformément bleue. Puis, au fur et à mesure que le temps passe, la coloration s'estompe lentement et finit par disparaître au bout de 18 à 20 heures environ. Il ne s'agit pas d'une diffusion, car on ne voit pas la teinte s'étendre et se diluer dans l'embryon, mais bien d'une décoloration du bleu par l'embryon lui-même jouant le rôle de réducteur. Cet effet est stable et on n'observe pas de recoloration par la suite.

#### 3) *Réduction du bleu de méthylène par le jus d'embryon.*

Puisque l'embryon lui-même était capable de décolorer le bleu, il devait être possible de le décolorer aussi avec du jus d'embryon. Pour le montrer, nous avons procédé de la manière suivante :

On mélange, dans un tube à essai, 3 $cm^3$ de jus d'embryon de 9 jours d'incubation, 3 $cm^3$ de solution aqueuse de bleu de méthylène à 1/500. On ajoute un peu

d'huile de vaseline pure pour mettre le mélange à l'abri de l'air, puis on met le tout à l'étuve à 56°. Environ 15 à 20 heures après, le mélange est devenu complètement incolore. On dispose ainsi d'une solution de leucodérivé à 1/1.000 dans du jus d'embryon.

#### 4) *Réduction du bleu de méthylène par un organe en culture.*

Une dernière méthode consiste à faire réduire une solution de bleu de méthylène par un organe embryonnaire cultivé *in vitro*. Nous nous sommes adressés à la méthode de culture organotypique de Wolff et Haffen (1951). Un morceau de peau d'embryon de Poulet de 8 jours d'incubation est placé sur un milieu de culture, puis on dépose sur l'organe une goutte (1/20 $cm^3$) de solution de bleu de méthylène à 1/1.000. Au bout de 3 ou 4 heures, on éponge l'excès de liquide et on laisse la culture se poursuivre en couveuse. Au bout de 24 heures de culture, l'organe est uniformément bleu, puis la coloration commence à s'estomper lentement. La décoloration est totale après 4 ou 5 jours de culture. On dispose ainsi d'une réserve de bleu de méthylène réduit, incluse dans un organe vivant.

Ces 3 dernières méthodes ont été essayées dans les expériences de radioprotection.

### E. — Effet radioprotecteur du leucodérivé.

Nous avons entrepris 3 séries d'expériences :

#### 1) *Bleu de méthylène réduit par l'embryon.*

Le processus expérimental est le suivant : on injecte, selon la technique habituelle, 1,4 $mm^3$ de solution aqueuse de bleu de méthylène à 1/200 ou à 1/1.000 à un embryon de 2 jours ; 18 à 20 heures après, on irradie l'embryon à la dose habituelle donnant 95 0/0 de cyclocéphales. Au 10e jour de l'incubation, les résultats sont les suivants :

a) *Injection de bleu de méthylène à 1/200* (M/74,78).

Tableau VII

*Résultats des expériences de protection au bleu de méthylène réduit* (M/74,78).

| | | |
|---|---|---|
| Morts | | 11 |
| Cyclocéphales anophtalmes | | 4 |
| Anophtalmes non cyclocéphales | pas d'yeux, bec normal | 3 |
| | pas d'yeux, bec réduit | 1 |
| Non anophtalmes Non cyclocéphales | 2 petits yeux, bec normal | 1 |
| | 2 petits yeux, bec réduit | 1 |

Fréquence de la cyclocéphalie 4/10 $p < 0,05$.
Fréquence de l'anophtalmie 8/10 $p < 0,05$.

On voit que sur 21 embryons ainsi traités, 11 sont morts, mais 6, sur les 10 vivants, ont été protégés contre la cyclocéphalie et 2/10 contre l'anophtalmie.

b) *Injection de bleu de méthylène à 1/1.000* (M/373,9).

Tableau VIII

*Résultats des expériences de protection au bleu de méthylène réduit* (M/373,9).

| | | |
|---|---|---|
| Morts | 57 | |
| Cyclocéphales anophtalmes | 18 | |
| Anophtalmes non cyclocéphales : pas d'yeux, petit bec | 4 | |
| Cyclocéphales non anophtalmes : 2 petits yeux, pas de bec | 4 | |
| Non cyclocéphales : 2 petits yeux, bec réduit | 16 | 26 |
| Non anophtalmes : œil gauche normal, œil droit réduit petit bec | 2 | |

Fréquence de la cyclocéphalie : $\frac{22}{44} = 50\ 0/0$

Fréquence de l'anophtalmie : $\frac{22}{44} = 50\ 0/0 \qquad p = 0{,}01.$

On voit que sur 101 embryons, 57 sont morts, sur les 44 restants, 22 ont été protégés de la cyclocéphalie, et 22 de l'anophtalmie. Il y a donc environ 50 0/0 de protection.

On remarque que les yeux sont aussi bien protégés que le bourgeon frontal, or nous savons que les yeux sont légèrement plus radiosensibles, on peut en déduire qu'ils sont un peu mieux protégés que le bec, peut-être à la suite d'une affinité particulière des yeux pour le bleu de méthylène. On voit en effet à l'injection une coloration particulièrement intense des tissus nerveux et des yeux.

2) ***Bleu de méthylène réduit par le jus d'embryon.***

Le mélange de jus d'embryon et de bleu de méthylène, une fois décoloré, est injecté à l'embryon dans les conditions habituelles ; l'irradiation est pratiquée 4 heures après.

Les résultats sont les suivants :

Tableau IX

*Résultats d'expériences de protection au bleu de méthylène réduit.*

| | | |
|---|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes | | 21 |
| Petit bec supérieur, anophtalmie | 2 | 12 |
| Bec supérieur normal, anophtalmie | 4 | |
| Bec supérieur réduit, microphtalmie | 4 | |
| Bec supérieur normal, microphtalmie | 1 | |
| Bec supérieur absent, microphtalmie | 1 | |
| Morts | | 10 |

Fréquence de la cyclocéphalie $\frac{21}{33}$ $p < 0{,}005$.

Fréquence de l'anophtalmie $\frac{27}{33}$ $p < 0{,}005$.

Sur 43 embryons, 10 sont morts et 12 sont protégés parmi les 33 survivants. Le bleu de méthylène réduit exerce donc encore son effet protecteur. Celui-ci est toutefois un peu plus faible que dans le cas où le bleu est réduit par l'embryon lui-même (30 0/0 au lieu de 50 0/0). Cette différence d'efficacité est peut-être due au fait qu'au moment de l'injection, le mélange bleu + jus subit une légère recoloration, par réaction avec l'oxygène de l'air. Il reste cependant suffisamment de leucodérivé pour que l'on obtienne une certaine protection.

### 3) *Bleu de méthylène réduit par un organe en culture.*

Un fragment de peau embryonnaire de Poulet de 8 jours d'incubation, imprégné de bleu de méthylène à 1/1.000 se trouve décoloré en 5 jours de culture. Ce fragment de peau est déposé au contact de la tête d'un embryon de 48 heures d'incubation, préalablement débarrassé de ses membranes. Après 5 à 6 heures de contact, on enlève le fragment de peau et on irradie de la manière habituelle.

Sur 15 embryons ainsi traités, 6 sont morts, 6 sont devenus cyclocéphales anophtalmes et 3 ont montré un petit bec supérieur et un petit œil droit. Les témoins, sur lesquels on avait placé un morceau de peau non imprégné de bleu de méthylène, sont tous devenus cyclocéphales anophtalmes après irradiation.

Il y a eu, ici aussi, une protection, assez faible il est vrai, due à la petite quantité de leucodérivé qui a pu diffuser dans l'embryon.

### F. — Expériences complémentaires.

#### 1) *Application de bleu de méthylène après l'irradiation.*

Si le bleu de méthylène est appliqué immédiatement après l'irradiation, les autres conditions expérimentales restant les mêmes, on ne trouve aucun phénomène de radioprotection, comme le montre le tableau suivant :

TABLEAU X

*Résultats d'expériences d'injection de bleu de méthylène après l'irradiation.*

| | |
|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes . . . . . | 12 |
| Bec supérieur réduit, microphtalme . . . | 1 |
| Morts . . . . . | 5 |

Il est ainsi confirmé que le bleu de méthylène, à l'état oxydé, n'est ni radioprotecteur, ni radioréparateur et qu'il n'acquiert pas cette dernière propriété, lorsqu'il passe à l'état réduit, 20 heures après l'irradiation.

#### 2) *Application de jus d'embryon.*

Lorsque le leucodérivé est obtenu par action du jus d'embryon, on peut se demander si le jus ne joue pas lui-même un rôle dans la radioprotection. Quelques expériences d'application de jus dilué de moitié avec du liquide de Tyrode, nous ont donné, après irradiation, 8 cyclocéphales anophtalmes sur 8 embryons. Le jus d'embryon n'est donc pas lui-même radioprotecteur.

### G. — Conclusions.

De cette série expérimentale, nous pouvons conclure que le bleu de méthylène, non radioprotecteur à l'état oxydé, modifie considérablement la radiosensibilité d'une ébauche embryonnaire lorsqu'il a été préalablement réduit en son leucodérivé.

Agit-il en interférant avec les sous-produits de la radiolyse de l'eau ou bien simplement en diminuant la tension d'oxygène au moment de l'irradiation ? Nous ne pouvons le dire, mais il semble bien que le potentiel d'oxydo-réduction du milieu au moment de l'irradiation joue un rôle important dans la radiosensibilité cellulaire.

## III. — Le cyanure.

Le cyanure fut un des premiers radioprotecteurs connus chez l'animal. D'après HERVE et BACQ (1949), 0,1 mg. de cyanure injecté immédiatement avant l'irradiation protège 50 0/0 des Souris traitées par une irradiation totale de 650 r, qui, seule,

induit une mortalité de 100 0/0. Le sulfocyanure est inefficace (Herve et Bacq, 1949). Cependant, d'après Betz (1950) le cyanure ne supprime aucune des lésions cellulaires et ne fait qu'agir sur les manifestations générales d'alarme. Il n'est efficace d'autre part que contre une dose de rayons X léthale minimale (Betz et Herve, 1950).

D'après Bacq et Herve (1951), le cyanure (1/4.000) protège partiellement des racines de pois contre les effets d'une dose de 500 r, il n'a cependant aucun effet radioprotecteur chez le Rat irradié à 800 r, à la concentration de 3 mg./kg. (Dowdy, Bennett et Chastain, 1950), alors que d'après Smith, Patt et Tyree (1951) il diminue la radiosensibilité du Rat (1.000 r).

P. Dé, A. Bose et S. Bose (1960) observent que le cyanure (1,5 à 3 mg./kg.) diminue de 50 0/0 la chute de l'index mitotique de la moelle osseuse du Rat irradié à 800 r.

Ces résultats contradictoires nous ont incité à essayer le pouvoir radioprotecteur du cyanure dans le cas d'une malformation expérimentale chez l'embryon de Poulet. Le processus expérimental sera le même que précédemment. Nous avons employé le cyanure de potassium.

### A. — Action du cyanure seul.

Après injection localisée de 1,4 mm³ de cyanure à différentes concentrations, on obtient les résultats suivants :

Tableau XI

*Malformations obtenues après injection de cyanure.*

| Concentration de cyanure / Embryons | M/13 1/200 | M/16,25 1/250 | M/26 1/400 | M/65 1/1.000 | M/650 1/10.000 |
|---|---|---|---|---|---|
| Morts | 4 | 5 | 9 | 4 | 3 |
| Normaux | 0 | 0 | 2 | 4 | 9 |
| Microphtalmes | 0 | 2 | 1 | 0 | 4 |
| Total | 4 | 7 | 12 | 8 | 16 |

Le cyanure se montre donc assez toxique, la dilution 1/2 léthale se trouve aux environs de 1/1.000. C'est la concentration que nous avons utilisée pour les expériences de radioprotection. Au point de vue tératologique, le cyanure provoque quelquefois de petites hémorragies, la seule malformation que l'on obtienne est la microphtalmie.

### B. — Action radioprotectrice du cyanure.

Suivant la technique habituelle, nous avons essayé le cyanure à 1/1.000 en injection chez le Poulet de 48 heures d'incubation. Les résultats du point de vue de la cyclocéphalie furent les suivants :

Tableau XII

*Résultats d'expériences de protection au cyanure.*

| | |
|---|---|
| Morts . . . . . | 24 |
| Cyclocéphales anophtalmes . . . . | 12 |
| Pas d'yeux, petit bec supérieur. . . | 1 |

On voit que dans ces conditions, le cyanure n'exerce aucun effet radioprotecteur sur l'embryon de Poulet, puisqu'on trouve 12 cyclopes sur 13. On remarque d'autre part une très forte mortalité : 24 sur 37.

### C. — Conclusion.

Des expériences précédentes, il ressort que le cyanure n'est pas radioprotecteur dans ces conditions. On peut attribuer cet échec à deux causes : ou bien le cyanure est trop toxique et il n'est pas possible d'en injecter une quantité suffisante pour avoir une radioprotection mesurable, ou bien le cyanure n'est pas radioprotecteur à l'échelon cellulaire chez l'embryon de Poulet. C'est cette dernière hypothèse qui semble la plus probable. En effet d'autres radioprotecteurs sont efficaces à cette concentration ; d'autre part, d'après Betz (1950) le cyanure ne modifie pas les lésions cellulaires, mais uniquement les manifestations générales d'alarme. D'après Dowdy, Bennett et Chastain (1950), le cyanure bloque les enzymes respiratoires, mais ne modifie pas la quantité d'$O_2$ présente dans les tissus, or on n'a de radioprotection qu'en diminuant l'oxygène tissulaire, non en réduisant le métabolisme (Gray, 1957).

## IV. — L'acide ascorbique.

L'acide ascorbique est un réducteur physiologique, donc susceptible d'exercer une influence radioprotectrice chez l'animal. D'après les résultats de Patt et coll. (1950) et de Bacq et Alexander (1955) c'est un radioprotecteur faible et irrégulier. Nous avons cependant essayé l'acide ascorbique avec notre technique.

### A. — Action de l'acide ascorbique seul.

Après injection de la quantité habituelle de solution d'acide ascorbique, nous obtenons les résultats suivants :

Tableau XIII

*Malformations obtenues après injection d'acide ascorbique.*

| Concentration d'acide ascorbique / Embryons | M/17,6 1/100 | M/35,2 1/200 | M/88 1/500 |
|---|---|---|---|
| Morts | 10 | 4 | 6 |
| Normaux | 5 | 12 | 4 |
| Microphtalmes | 1 | 0 | 2 |

Les expériences de radioprotection ont été faites avec une solution à 1/200, soit $\frac{M}{35,2}$.

### B. — Effet radioprotecteur de l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique, utilisé dans les mêmes conditions que la cystéamine pour les expériences de radioprotection et à la concentration de $\frac{1}{200}$, nous a donné les résultats suivants :

Tableau XIV

*Résultats d'expériences de protection à l'acide ascorbique.*

| | |
|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes | 21 |
| Bec supérieur normal, anophtalme | 2 |
| Bec supérieur réduit, monophtalme gauche | 1 |
| Morts | 11 |

On voit que sur 24 embryons, 3 seulement ont échappé à la cyclocéphalie et 1 à l'anophtalmie. L'acide ascorbique n'est donc pas radioprotecteur dans ces conditions.

### C. — Conclusions.

L'échec de l'acide ascorbique comme radioprotecteur, peut être dû à la faible intensité de son pouvoir réducteur, ou bien au fait que son mode d'action est différent de celui des corps déjà utilisés. D'après Ellis (1942), il agit en accélérant la régénération des globules blancs. D'autre part, d'après Babin, Coustou et Delmar (1955), il disparaît à la suite d'une irradiation (1.600 r/minute) en solution aqueuse.

## V. — Diéthyldithiocarbamate de sodium (DDC).

Avec le DDC nous passons à une classe de substances, les chélateurs, dont Bacq et Herve ont démontré l'effet radioprotecteur chez la Souris en 1953 (Bacq et Herve, 1953). Van Bekkum (1956) a confirmé et étudié l'effet protecteur de différents dérivés de l'acide dithiocarbamique chez la Souris. D'après Corradi, Paoletti et Pozza (1958), le diéthyldithiocarbamate de sodium exerce une action radioprotectrice plus marquée chez la Souris que la cystéamine à des doses équivalentes ; il protège aussi légèrement le Poussin de 20 jours contre une dose de 2.000 r de rayons X (Beaumariage, 1959).

Nous avons donc entrepris d'essayer l'effet du DDC sur une malformation de l'embryon de Poulet, suivant notre technique.

### A. — Effet du DDC seul.

Les injections ont été faites de la manière habituelle et les expériences d'injection seule ont donné, suivant les concentrations utilisées, les résultats suivants :

Tableau XV

*Malformations obtenues après injection de diéthyldithiocarbamate de Na.*

| Concentration de DDC / Embryons | M/225 1/1.000 | M/22,5 1/100 | M/11,25 1/50 | M/4,5 1/20 |
|---|---|---|---|---|
| Morts | 3 | 3 | 3 | 5 |
| Normaux | 7 | 7 | 10 | 10 |
| Microphtalmes | 1 | 2 | 2 | 1 |
| Total | 11 | 12 | 15 | 16 |

On voit que toutes les concentrations utilisées ont donné à peu près le même résultat du point de vue de la mortalité et des malformations,

nous n'avons obtenu que quelques cas de microphtalmie, jamais de cyclocéphalie. Par conséquent, comme il s'agit d'un corps très peu toxique, nous avons utilisé, pour les expériences de radioprotection, des solutions concentrées à 1/20.

### B. — Effet radioprotecteur.

#### 1) *Technique habituelle.*

Une série d'expériences d'injection et d'irradiation selon la technique habituelle, nous a donné les résultats suivants, pour une injection de solution à 1/20 et une irradiation de 5.000 r, 4 heures après.

Tableau XVI

*Résultats d'expériences de protection au DDC*
(irradiation 5.000 r).

| | | | |
|---|---|---|---|
| Morts | | | 18 |
| Cyclocéphales anophtalmes | | | 24 |
| Pas d'yeux, petit bec supérieur | 14 | 16 | 23 |
| Pas d'yeux, bec supérieur normal | 2 | | |
| Petits yeux, petit bec | 3 | | |
| Œil gauche normal, œil droit réduit, bec normal | 4 | 7 | |
| Petit œil gauche, pas d'œil droit, petit bec supérieur | 3 | | |
| Total | | | 65 |

On voit, d'après ces résultats, que le DDC est protecteur, dans les conditions de l'expérience. Toutefois, c'est un radioprotecteur moyen puisque environ 50 0/0 (23/47) des embryons sont protégés, et que l'œil est peu protégé.

Fréquence cyclocéphalie 24/47 = 51 0/0
Fréquence anophtalmie 40/47 = 85 0/0
$p < 0{,}005$.

Devant ces résultats, significatifs, mais relativement peu satisfaisants, nous avons décidé de refaire une série d'expériences en donnant une dose de rayonnement plus faible, de manière à faire apparaître éventuellement un écart plus grand.

#### 2) *Expériences à dose plus faible.*

Dans cette série expérimentale, les témoins reçoivent une dose de rayonnement correspondant à 3.000 r. Tous les autres éléments de la technique sont maintenus.

Les résultats sont les suivants :

TABLEAU XVII

*Résultats d'expériences de protection au DDC*
(irradiation 3.000 r).

| | DDC + 3.000 r | Témoins 3.000 r |
|---|---|---|
| Morts | 13 | 4 |
| Cyclocéphales anophtalmes | 1 | 15 |
| Pas d'yeux, bec normal | 1 | 1 |
| Pas d'yeux, bec réduit | 2 (3) | 2 (3) |
| Petits yeux, petit bec | 8 | 4 |
| Petit œil gauche, pas d'œil droit, petit bec supérieur | 2 | 1 |
| Œil gauche normal, œil droit réduit, bec normal | 3 (13) 16 | 0 (6) 9 |
| Monophtalme | 0 | 1 |
| Total | 30 | 28 |

On voit apparaître ici des résultats plus significatifs. En effet on peut écrire :

TABLEAU XVIII

*Résumé des données du tableau XVII*

| | DDC + 3.000 r | 3.000 r |
|---|---|---|
| Cyclocéphales | 1/17 = 6 0/0 | 15/24 = 63 0/0 |
| Anophtalmes | 4/17 = 24 0/0 | 18/24 = 75 0/0 |

$p < 0{,}005$.

Ces résultats confirment les précédents et en augmentent la signification, pour une dose donnant 63 0/0 de cyclocéphales chez les témoins, on n'en a que 6 0/0 chez les protégés.

On peut donc conclure que le DDC est un radioprotecteur d'une efficacité moyenne chez le Poulet.

### 3) *Expériences complémentaires.*

a) *Injection sur la région caudale.*

Si l'irradiation habituelle (5.000 r) est faite 4 heures après une injection de carbamate sur la région caudale, on obtient les résultats suivants :

Tableau XIX

*Résultats d'expériences d'irradiations après injection de DDC sur la région caudale.*

| | | |
|---|---|---|
| Morts | | 36 |
| 2 petits yeux, petit bec | | 1 |
| Cyclocéphales anophtalmes | 16 | 19 |
| » » sans croupion | 2 | |
| » » hémisome | 1 | |
| Total | | 56 |

On observe en premier lieu une mortalité beaucoup plus considérable qu'après injection sur la région céphalique : 36/56 = 64 0/0, due sans doute à une plus grande sensibilité de cette région au moment de l'injection. On obtient aussi, parmi les survivants quelques malformations de la partie postérieure : absence de croupion et hémisomie, dans un petit nombre de cas.

Du point de vue de la radioprotection, il n'y a absolument aucun effet puisque l'on obtient 19/20 cyclocéphales anophtalmes. Le phénomène de radioprotection est donc bien dû à la présence du DDC dans la partie irradiée.

b) *Injection après l'irradiation.*

Si l'injection est faite immédiatement après l'irradiation, toutes choses égales par ailleurs, on obtient les résultats suivants :

Tableau XX

*Résultats d'expériences d'injection de DDC après l'irradiation.*

| | |
|---|---|
| Morts | 2 |
| Cyclocéphales anophtalmes | 21 |

Tous les embryons sont atteints, il s'agit donc bien d'une radioprotection non d'une radioréparation.

C. — Conclusion.

De ces séries expérimentales, il résulte que le diéthyldithiocarbamate de sodium est un radioprotecteur efficace contre une malformation provoquée, chez l'embryon de Poulet, par les rayons X.

Le DDC est un agent de chélation, c'est-à-dire qu'il peut former des complexes avec les ions métalliques. On peut donc émettre l'hypothèse (Bacq, Herve, 1953) que l'intervention d'ions métalliques, dans le mécanisme d'action des radiations ionisantes, doit être prise en considération.

Une autre hypothèse a été émise par Lelièvre et Betz (1961) qui ont montré que le versène diminue la respiration d'homogénats de foie et de rein de Rats. Ils pensent que cet effet, dû sans doute à une altération des mitochondries, pourrait rendre compte de l'influence radioprotectrice des chélateurs.

## VI. — 8-Oxyquinoline.

D'après Bacq, la 8-oxyquinoline est radioprotectrice chez la Souris, quoique très toxique. Nous l'avons donc essayée chez le Poulet, selon la technique habituelle.

### A. — Effet de la 8-oxyquinoline seule.

Immédiatement après une injection de 8-oxyquinoline à 1/500, le cœur manifeste, dans la plupart des cas, une réaction violente. Il se met à battre très vite (tachycardie) et le sang circule mal, il oscille dans les vaisseaux, des hémorragies apparaissent aussitôt et la tête baigne dans une mare de sang.

Du point de vue de la mortalité et des malformations, on obtient les résultats suivants :

Tableau XXI

*Malformations obtenues après injection de 8-oxyquinoline.*

| Concentration en 8-oxyquinoline / Embryons | M/145 1/1.000 | M/72,5 1/500 |
|---|---|---|
| Morts | 6 (37,5 0/0) | 9 (39 0/0) |
| Microphtalmes droits | 2 | 2 |
| Normaux | 8 | 12 |
| Total | 16 | 23 |

La concentration de 1/500, qui donne environ 40 0/0 de mortalité et quelques cas de microphtalmie, a été utilisée pour les expériences de radioprotection.

### B. — Effet radioprotecteur.

#### 1) *Technique habituelle.*

La technique habituelle, appliquée au cas de l'oxyquinoline à 1/500, nous a donné les résultats suivants, pour une irradiation de 4.000 r :

Tableau XXII

*Résultats d'expériences de protection à la 8-oxyquinoline*
(irradiation 5.000 r).

| | |
|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes . . . . | 10 |
| Pas d'yeux, petit bec . . . . . | 1 |
| Morts . . . . . | 27 |
| Total . . . . . | 38 |

On voit apparaître une forte mortalité et une absence totale de protection. Nous avons alors essayé d'abaisser la dose de rayonnement, comme dans le cas du DDC, de manière à faire apparaître un effet qui ne se manifeste pas pour la dose de 5.000 r.

2) ***Dose d'irradiation réduite.***

Dans ce cas, nous appliquons une dose de rayonnement correspondant à 4.000 r, toutes choses égales par ailleurs.

Les résultats sont les suivants :

Tableau XXIII

*Résultats d'expériences de protection à la 8-oxyquinoline*
(irradiation 4.000 r).

| | 8-oxyquinoline + 4.000 r | Témoins 4.000 r |
|---|---|---|
| Morts . . . . . | 34 | 3 |
| Cyclocéphales anophtalmes . . . . . | 6 | 54 |
| Petit bec, anophtalmes . . . . . | 4 } 9 | 0 |
| Petit bec, microphtalmes . . . . . | 5 } | 6 |
| Total . . . . . | 49 | 63 |

Cyclocéphalie $p < 0{,}005$.
Anophtalmie $p < 0{,}03$.

La proportion de cyclocéphalie passe de 90 0/0 chez les témoins (54 sur 60) à 40 0/0 (6 sur 15) en présence de 8-oxyquinoline. Ce corps a donc exercé une influence protectrice contre une irradiation de 4.000 r. Ces résultats indiquent que la 8-oxyquinoline est un radioprotecteur faible, qui ne se manifeste que pour des doses de rayonnement inférieures à la dose donnant 100 0/0 de malformations.

## VII. — Hyposulfite de sodium.

Dans la série des corps réducteurs, l'hyposulfite de sodium a donné quelques résultats positifs en ce qui concerne la radioprotection. D'après Mikaelsen (1954), l'hyposulfite diminue de façon remarquable le nombre des ruptures chromosomiques des racines de *Tradescantia paludosa*, irradiées aux rayons $\gamma$ du cobalt 60. L'hydrosulfite de sodium d'autre part protège des solutions de pepsine contre l'inactivation induite par les rayons X (Drasil, Drasilova, 1956).

Nous avons effectué quelques expériences, selon notre technique, qui n'ont pas donné de résultat encourageant, comme le montre le tableau suivant :

L'hyposulfite de sodium est injecté à la concentration de $\frac{1}{225}$ soit $\frac{M}{35{,}55}$.

Tableau XXIV

*Résultats d'expériences de radioprotection à l'hyposulfite de* Na.

| | 5.000 r | 4.000 r |
|---|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes . . . . . | 12 | 8 |
| Bec supérieur réduit, anophtalmes . . . . | 2 | 0 |
| Bec supérieur réduit, microphtalmes . . . | 0 | 3 |
| Morts . . . . . | 18 | 8 |

Aucune des doses de rayons X utilisées ne fait apparaître une influence radioprotectrice de l'hyposulfite de sodium.

## VIII. — Anoxie.

### A. — Introduction.

La modification de la radiosensibilité par anoxie ou hypoxie tissulaire a été abondamment étudiée au cours des dernières années, par des moyens très variés et sur des matériels très différents. Les résultats sont en général très concordants, la cellule est d'autant plus radiorésistante qu'elle est moins oxygénée. La première observation dans ce sens a été faite par Schwarz en 1909, qui a remarqué le rôle protecteur de la suppression

## Tableau XXV

*Principaux cas de radioprotection par anoxie.*

| Espèce | Protecteur | Épreuve | Référence |
|---|---|---|---|
| Levures. | Absence de $O_2$. | Survie. | Anderson et Turkowitz, 1941. |
| Drosophile ♂. | Absence de $O_2$. | Mutations récessives léthales. | Baldwin et Sgourakas, 1950. |
| Nymphes de *Rhodnius*. | Azote. | Cellules épidermiques. | Baldwin et Salthouse, 1959. |
| Cellules de tumeur ascite. | Absence de $O_2$. | Changement cytologique, croissance. | Conger, 1956. |
| Cellules de moelle osseuse de Souris. | Hypoxie. | Aberrations chromosomiques. | Devik, 1952. |
| Rat. | Anoxie. | Léthalité. | Dowdy, Bennett et Chastain, 1950. |
| Racines de Haricot. | Hydrogène. | Lésions cellulaires. | Ebert et Howard, 1955. |
| Neuroblastes de Sauterelle. | Azote ou $CO_2$. | Mitose. | Gaulden et Nix, 1950. |
| Microspores de *Tradescantia paludosa*. | Azote, hélium, argon. | Aberrations chromosomiques. | Giles et Riley, 1950. |
| *Daphnia magna*. | Diminution de tension de $O_2$. | Léthalité. | Held et Bellamy, 1950. |
| *Escherichia coli*. | Atmosphère de $N_2$, He, $H_2$, $CO_2$. | Survie. | Hollænder, Stapleton et Martin, 1951. |
| Bactérie *Shigella flexnere*. | Baisse de tension de $O_2$. | Survie. | Howard-Flanders, 1957. |
| Souris. | Baisse de tension partielle $O_2$. | Croissance de la queue. | Howard-Flanders et Wright, 1957. |
| *Paramecium aurelia*. | Azote. | Action mutagène. | Kimball et Gaither, 1952. |
| Lapin. | Suppression de la circulation dans l'oreille. | Radio-lésions de l'oreille. | Langhof et Schwenke, 1956. |
| Souris. | Atmosphère pauvre en $O_2$. | Survie. | Limperos, 1951. |
| Rat. | Autoanoxie. | Survie. | Loiseleur et Petit, 1959. |
| Racines de Haricot. | Absence $O_2$. | Radiosensibilité. | Mottram, 1935. |
| Œufs de *Triton alpestris*. | Hypoxie. | Développement. | Peters, 1955. |
| Radicelles. | Atmosphère de $CO_2$. | Croissance. | Petry, 1923. |
| Souris. | Hypoxie (5 0/0, $O_2$, 95 0/0 $H_2$). | Effet léthal, stérilité. | Russel, 1951. |

| Espèce | Protecteur | Épreuve | Référence |
|---|---|---|---|
| Oeufs de *Triton alpestris.* | Hypoxie. | Anomalies du développement. | Sanides, 1956. |
| Rats de 1 jour. | Azote 100 0/0. | Survie. | Smith, Patt et Tyree, 1951. |
| *Aspergillus terreus.* | Faible tension $O_2$. | Mutations. | Stapleton et Hollænder, 1952. |
| Poulet. | Hypoxie. | Mortalité. | Stearner, Christian et Brues, 1954. |
| Racines de *Vicia faba.* | Baisse de tension de $O_2$. | Aberrations chromosomiques. | Thoday et Read, 1947. |
| Souris. | Ligature du pédicule de la rate. | Poids de la rate. | L. Weiss, 1959. |
| Souris. | 10 0/0 $O_2$. | Épilation des jambes. | Wilson, 1959. |
| Rats. | Fatigue. | Mort. | Brown et White, 1958. |

de la circulation sanguine, par compression mécanique de la peau humaine, dans la radiosensibilité cutanée. Quelques autres cas de radioprotection par anoxie sont signalés par Holthusen en 1921, J. Jolly en 1924 et Lacassagne en 1942. Depuis, le phénomène a été souvent confirmé et étendu à de nombreuses espèces.

Le tableau XXV en donne les principaux cas.

Nous avons entrepris une série de recherches sur l'action radioprotectrice de l'anoxie contre une malformation expérimentale obtenue par une irradiation localisée chez l'embryon de Poulet. L'air ambiant est remplacé par de l'hydrogène, de l'azote ou du gaz carbonique et nous comparons les résultats, après irradiation dans ces différents gaz et dans l'air.

La technique a été décrite au chapitre premier, les résultats sont exposés ci-dessous.

## B. — Action radioprotectrice de l'hydrogène.

### 1) *Irradiations simples en baignoire.*

Avant d'essayer l'hydrogène comme radioprotecteur, il fallait savoir si une irradiation simple à travers le couvercle de plexiglass donnait les mêmes résultats que les irradiations habituelles et quelle serait la dose équivalente à employer. Deux facteurs viennent modifier la dose à utiliser :

a) *L'absorption du plexiglass.*

La plaque utilisée pèse 0,4 g./cm² et les mesures au dosimètre ont montré qu'elle absorbe 16 0/0 du rayonnement incident. La correction de dosage à apporter s'exprime donc ainsi :

$$d_1(1 - \rho) = d \qquad \text{où} \qquad \rho = 0{,}16.$$

b) *Modification de la distance.*

L'interposition de la plaque de plexiglass entraîne en effet une augmentation de la distance de la source à l'embryon d'environ 1 centimètre. La correction de dose à apporter s'exprimera donc ainsi :

$$\frac{d_2 r^2_1}{r^2_2} = d_1 \qquad \text{où} \qquad r_1 = 12 \text{ centimètres}$$

$$r_2 = 13 \text{ centimètres.}$$

On trouve donc au total :

$$d_2 = \frac{r^2_2}{r^2_1} \frac{1}{(1 - \rho)} . d \qquad d_2 = \frac{13^2}{12^2} \frac{1}{(1 - 0{,}16)} 5.000 \neq 7.000 \text{ r.}$$

La dose donnant 95 0/0 de cyclocéphales anophtalmes doit donc correspondre ici à une irradiation de 7.000 r dans les conditions précédentes.

Autrement dit, pour obtenir le même effet, il suffit de multiplier par 1,4 le temps d'irradiation utilisé précédemment.

Une série d'irradiations simples a été faite pour confirmer expérimentalement ce résultat :

TABLEAU XXVI

*Fréquence de cyclocéphalie obtenue après irradiations simples en baignoire. Les doses en r sont mesurées dans l'air à 12 cm.*

| | 5.500 r | 7.000 r |
|---|---|---|
| Cyclocéphales, anophtalmes . . . . . | 26 | 43 |
| Non cyclocéphales, anophtalmes . . . . | 12 | 0 |
| Cyclocéphales, non anophtalmes . . . . . | 3 | 0 |
| Non cyclocéphales, non anophtalmes . . . | 14 | 4 |
| Morts . . . . . | 2 | 13 |
| Total . . . . . | 57 | 60 |

On a donc :

TABLEAU XXVII

*Résumé des données du tableau XXVI.*

| | 5.500 r | 7.000 r |
|---|---|---|
| Fréquence de la cyclocéphalie . . . . . | 53 0/0 | 92 0/0 |
| Fréquence de l'anophtalmie . . . . . | 69 0/0 | 92 0/0 |

Les expériences seront donc faites à 7.000 r de façon à retrouver le dosage donnant environ 95 0/0 de cyclocéphales, utilisé précédemment.

### 2) *Effet de l'hydrogène seul.*

Si on place des embryons de Poulet, à 48 heures d'incubation, dans une atmosphère d'hydrogène pendant 4 heures, on obtient 8 normaux et 4 morts sur 12 embryons. Il est donc possible de priver les embryons d'oxygène pendant quelques heures avant l'irradiation. L'expérience a été conduite de la manière suivante : les œufs ouverts selon la technique habituelle sont placés dans la baignoire, qui est refermée avec un couvercle de plexiglass. On fait passer un courant d'hydrogène pendant 1 heure, puis on ferme les robinets et on remet la baignoire en couveuse pour une durée de 3 heures. Les embryons sont ensuite irradiés selon la technique habituelle, puis remis dans l'air après l'irradiation.

### 3) *Effet radioprotecteur de l'hydrogène.*

*a*) Les résultats furent les suivants :

Tableau XXVIII

*Résultats des expériences de radioprotection à l'hydrogène* (irradiation 7.000 r).

| | Hydrogène + 7.000 r | Témoins 7.000 r |
|---|---|---|
| Morts | 5 | 0 |
| Cyclocéphales anophtalmes | 2 | 42 |
| Normaux | 5 | |
| Petit bec, microphtalmes | 12 (22) | |
| Bec normal, monophtalmes | 5 (26) | 6 |
| Bec normal, anophtalmes | 3 (4) | |
| Petit bec, anophtalmes | 1 | |
| Total | 33 | 48 |

Cyclocéphalie $p < 0{,}005$.
Anophtalmie $p < 0{,}005$.

On voit apparaître ici une bonne protection de l'ébauche irradiée en présence d'hydrogène, puisqu'il n'y a que 2 cyclopes sur 28 (7 0/0) contre 12 sur 48 (87,5 0/0) chez les témoins. On remarque d'autre part que, en plus de la quantité d'embryons protégés, la qualité de la protection est meilleure que dans les cas précédents : 5 embryons sont normaux, alors que seule la cystéamine en avait donné 2 précédemment ; 13 embryons ont un bec normal.

En ce qui concerne l'anophtalmie, la protection est aussi bonne, puis-

que 6 embryons sur 28 (21 0/0) seulement sont anophtalmes alors que 43 sur 48 (90 0/0) le sont chez les témoins.

*b*) Si la mise en atmosphère d'hydrogène est faite immédiatement après l'irradiation, une série d'expériences nous a donné, sur 6 embryons, 6 cyclocéphales anophtalmes. L'hydrogène est donc bien un radioprotecteur vrai, il n'y a pas de réparation.

c) *Augmentation de la dose de rayons X.*

Devant ce résultat, très net, nous avons pensé qu'il serait intéressant de rechercher jusqu'où s'exerce cette protection, c'est-à-dire jusqu'à quelle dose de rayons X on observe encore un tel phénomène. Nous avons donc fait une série d'expériences analogues, en augmentant la dose d'irradiation et nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau XXIX

*Résultats d'expériences de radioprotection à l'hydrogène* (irradiation 10.000 r).

| | Hydrogène + 10.000 r |
|---|---|
| Mort | 1 |
| Cyclocéphales anophtalmes | 6 |
| Petits yeux, petit bec | 5 } 8 |
| Pas d'yeux, petit bec | 3 } |

On voit qu'il y a encore ici une proportion non négligeable d'embryons protégés : 8 sur 14 (57 0/0). Il faut aller jusqu'à une irradiation de 14.000 r pour retrouver une proportion de 90 0/0 de cyclocéphales.

On remarque cependant qu'il n'y a plus de normaux, la qualité de la protection a aussi baissé.

En ce qui concerne l'anophtalmie, 6 sur 14 (36 0/0) sont protégés, pour 10.000 r.

4) ***Conclusions.***

L'hydrogène semble être le meilleur radioprotecteur rencontré jusqu'à présent. La question se pose de savoir s'il agit spécifiquement, ou simplement en déplaçant l'oxygène. Des expériences avec d'autres gaz résoudront la question.

C. — **Azote.**

L'azote a été éprouvé comme radioprotecteur, exactement dans les mêmes conditions que l'hydrogène, afin de savoir si l'on retrouverait les mêmes résultats.

### 1) *Résultats.*

Une série expérimentale, dans laquelle les embryons ont été irradiés après avoir baigné pendant 4 heures en atmosphère d'azote, nous a donné les résultats suivants :

TABLEAU XXX

*Résultats d'expériences de radioprotection en atmosphère d'azote.*

| | Azote + 7.000 r | | | Témoins 7.000 r |
|---|---|---|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes | 6 | | | 46 |
| Bec supérieur réduit, anophtalmes | 3 | 9 | | |
| Bec supérieur normal, anophtalmes | 6 | | | |
| Bec supérieur réduit, microphtalmes. | 6 | | 23 | 4 |
| Bec supérieur normal, monophtalmes | 4 | 14 | | |
| Bec supérieur normal, microphtalmes | 3 | | | |
| Normal | 1 | | | |
| Morts | 2 | | | 0 |
| Total. | 31 | | | 50 |

Cyclocéphalie / Anophtalmie : $p < 0{,}005$.

Ce tableau fait apparaître des résultats très significatifs, puisque nous ne trouvons que 6 embryons cyclocéphales sur 29 (21 0/0) alors qu'il y en a 46 sur 50 (92 0/0) chez les témoins. On trouve d'autre part 15 anophtalmes sur 29 (52 0/0).

On observe donc en atmosphère d'azote, une protection du même ordre de grandeur qu'en atmosphère d'hydrogène. Elle est cependant légèrement moins prononcée, surtout en ce qui concerne l'anophtalmie. Du point de vue qualitatif, on observe aussi une protection un peu moins bonne.

Si la mise en atmosphère d'azote est faite après l'irradiation, on ne peut mettre en évidence aucun phénomène de radioprotection.

### 2) *Conclusions.*

Ces expériences montrent que, comme l'hydrogène, l'azote protège l'embryon contre l'apparition de la cyclocéphalie. Cet effet semble dû à la privation d'oxygène que subit l'embryon pendant l'expérience.

On note cependant que l'hydrogène paraît légèrement plus efficace vis-à-vis de la cyclocéphalie, quoique la différence ne soit pas signifi-

cative ($p = 0{,}13$). L'anophtalmie, plus sensible, révèle mieux ce phénomène, puisque la différence est ici hautement significative ($p = 0{,}01$).

On peut penser que l'hydrogène, ayant un pouvoir de diffusion plus grand que l'azote, agit un peu plus efficacement au niveau cellulaire.

### D. — Anhydride carbonique.

Une troisième série expérimentale a été entreprise, dans laquelle l'hydrogène ou l'azote des expériences précédentes a été remplacé par du $CO_2$.

#### 1) *Action du $CO_2$ seul.*

L'expérience a montré que le $CO_2$ est beaucoup plus toxique que l'hydrogène ou l'azote. On ne peut, en effet, laisser les embryons pendant 1 heures dans une atmosphère de $CO_2$ sans avoir une mortalité considérable. Les quelques rares survivants présentent, le lendemain de la mise en atmosphère de $CO_2$ une absence totale de sang, alors que le cœur continue de battre quelque temps. La mortalité est de 100 0/0 en 48 heures. Une incubation d'une heure en atmosphère de $CO_2$, au contraire, laisse survivre les 3/4 des embryons traités.

#### 2) *Action radioprotectrice du $CO_2$.*

Les expériences sont conduites de la manière habituelle, à la seule différence que les embryons ne séjournent qu'une heure avant l'irradiation en atmosphère de $CO_2$.

Les résultats sont les suivants :

Tableau XXXI

*Résultats d'expériences de radioprotection en atmosphère de $CO_2$.*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Cyclocéphales anophtalmes . . . . | | | 5 |
| Bec supérieur réduit, anophtalmes . . | 5 | 6 | |
| Bec supérieur normal, anophtalme . . | 1 | | |
| Bec supérieur normal, microphtalmes . | 2 | 6 | 12 |
| Bec supérieur normal, monophtalmes . | 3 | | |
| Normal . . . . . | 1 | | |
| Morts. . . . . | | | 9 |
| Total. . . . . | | | 26 |

Cyclocéphalie $p < 0{,}005$.
Anophtalmie $p < 0{,}01$.

Nous voyons apparaître ici encore, une protection assez remarquable des embryons puisque nous n'avons que 5 cyclocéphales sur 17 embryons (29 0/0) et 11 anophtalmes sur 17 (65 0/0). Les résultats, toutefois, sont un peu moins bons que pour l'azote et l'hydrogène, probablement du fait que le séjour d'une heure en atmosphère de $CO_2$ conduit à une anoxie moins poussée qu'une incubation de 4 heures dans l'hydrogène ou l'azote.

Si l'incubation en atmosphère de $CO_2$ a lieu après l'irradiation, aucun phénomène de radioprotection ne peut être mis en évidence.

### 3) *Conclusion.*

Comme l'hydrogène et l'azote, le $CO_2$, par l'anoxie qu'il provoque, protège l'embryon de Poulet contre l'effet tératogène des rayons X.

## E. — Comparaison des résultats de l'anoxie et conclusions.

Les résultats obtenus ci-dessus par les différents procédés d'anoxie, pour une même dose de rayons X, sont comparés dans le tableau suivant :

TABLEAU XXXII

*Comparaison des résultats de protection par anoxie.*

| | Hydrogène | Azote | $CO_2$ | Air |
|---|---|---|---|---|
| Cyclocéphales . . . | 7 0/0 | 21 0/0 | 29 0/0 | 92 0/0 |
| Anophtalmes . . . | 21 0/0 | 52 0/0 | 65 0/0 | 92 0/0 |

On observe que la protection de la cyclocéphalie et de l'anophtalmie diminue lorsque l'on passe de l'hydrogène à l'azote d'une part, de l'azote à l'anhydride carbonique d'autre part. Cette diminution n'est toutefois pas significative en ce qui concerne la cyclocéphalie ($p = 0{,}07$ entre $H_2$ et $CO_2$) ; elle l'est en ce qui concerne l'anophtalmie ($p = 0{,}01$ entre $H_2$ et $N_2$).

On peut dire cependant que l'hydrogène est le meilleur des gaz radioprotecteurs, comme le montre clairement une malformation très sensible : l'anophtalmie. L'hydrogène doit-il cette propriété à sa grande capacité de diffusion ou bien a-t-il en plus une certaine action spécifique ?

D'après M. Ebert et A. Howard (1958) l'hydrogène pourrait réagir avec les radicaux hydroxyles formés dans l'eau selon la formule : $OH^o + H_2 \rightarrow H^o + OH_2$, mais cette réaction est beaucoup moins probable que la réaction avec une molécule organique RH : $OH^o + RH \rightarrow R^o + OH_2$.

*En conclusion* de ce chapitre, nous pouvons dire que l'anoxie obtenue chez l'embryon de Poulet par déplacement de l'oxygène de l'air au moyen de gaz inertes tels que l'hydrogène, l'azote ou le $CO_2$ confère une excellente radioprotection à l'embryon vis-à-vis d'une irradiation localisée. L'hydrogène est le gaz le plus efficace. La protection ainsi obtenue semble être meilleure que celle obtenue par les substances chimiques, à la fois quantitativement et qualitativement. Certains embryons sont même tout à fait normaux et semblent ne pas avoir été irradiés, ce que nous n'avons jamais obtenu avec un produit chimique, excepté la cystéamine.

## IX. — Radiosensibilisation par l'oxygène.

Une fois établi le phénomène de radioprotection par anoxie chez l'embryon de Poulet, il convenait de tenter l'expérience inverse, c'est-à-dire de rechercher si une hyperoxie sensibiliserait l'embryon à l'action tératogène des rayons X. La technique utilisée au chapitre précédent est apte à répondre à cette question, si on la modifie légèrement. Il suffit en effet de diminuer la dose de rayonnement de façon que les témoins, irradiés dans l'air, ne soient cyclocéphales que dans une proportion voisine de 50 0/0. On pourra voir, alors, si les embryons irradiés en atmosphère d'oxygène pur montrent une plus grande proportion de cyclocéphalie.

### A. — Technique et action de l'$O_2$ seul.

La technique est la même que celle employée au chapitre précédent, cependant les doses de rayonnement employées sont plus faibles et correspondent à 2.800 et 3.500 r.

L'incubation en atmosphère d'oxygène a duré 4 à 5 heures avant l'irradiation, les œufs sont remis à l'air immédiatement après. Aucune malformation n'a été constatée après un tel séjour en atmosphère d'oxygène, alors qu'un séjour prolongé de 24 heures se révèle très toxique :

$O_2$ seul 5 heures : sur 9, 2 morts et 7 normaux,

$O_2$ seul 24 heures : tous morts d'hémorragie.

### B. — Résultats.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus pour des doses d'irradiation de 3.500 r.

## Tableau XXXIII

*Résultats d'expériences de sensibilisation par l'oxygène.*

(irradiation 3.500 r).

| | $O_2$ + 3.500 r | | | Air + 3.500 r | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Morts | | | 25 | | | 7 |
| Cyclocéphales anophtalmes | | | 24 | | | 11 |
| Pas d'yeux, petit bec | 1 | 3 | | 4 | 5 | |
| Pas d'yeux, bec normal | 2 | | | 1 | | |
| Petits yeux, bec normal | 1 | 1 | 4 | 0 | 5 | 10 |
| Petits yeux, petit bec | 0 | | | 4 | | |
| Normaux | 0 | | | 1 | | |
| Total | | | 53 | | | 28 |

On voit que la proportion de cyclocéphalie passe de 52 0/0 (11/21) dans l'air à 86 0/0 (24/28) dans l'oxygène. Il y a donc une sensibilisation très nette des embryons irradiés en présence d'oxygène ($p = 0{,}01$).

En ce qui concerne l'anophtalmie, la proportion passe de 76 0/0 (16/21) dans l'air à 96 0/0 (27/28). La différence est légèrement plus faible, mais encore significative ($p = 0{,}04$).

Pour une irradiation de 2.800 r, on trouve les résultats suivants :

## Tableau XXXIV

*Résultats d'expériences de sensibilisation en atmosphère d'oxygène.*

(irradiation 2.800 r).

| | $O_2$ + 2.800 r | | | Air + 2.800 r | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Morts | | | 43 | | | 20 |
| Cyclocéphales anophtalmes | | | 21 | | | 18 |
| Pas d'yeux, petit bec | 5 | 6 | | 9 | 15 | |
| Pas d'yeux, bec normal | 1 | | | 6 | | |
| Petits yeux, bec normal | 0 | 2 | 8 | 4 | 8 | 23 |
| Œil gauche normal, pas de bec | 1 | | | 2 | | |
| Petits yeux, petit bec | 1 | | | 2 | | |
| Total | | | 72 | | | 61 |

On voit apparaître ici un résultat analogue au précédent, la proportion de cyclocéphales passe de 44 0/0 (18/41) dans l'air à 72 0/0 (21/29) dans l'oxygène ($p = 0{,}02$). Nous observons donc une sensibilisation à peu près équivalente, qui confirme le résultat précédent.

En ce qui concerne l'anophtalmie, la proportion passe de 80 0/0 (33/41) dans l'air, à 93 0/0 (27/29) dans l'oxygène, différence plus faible, qui n'est plus significative ($p = 0{,}12$).

### C. — Expériences complémentaires.

Si la mise en atmosphère d'oxygène est faite après l'irradiation, on n'observe plus de différence entre les témoins et les embryons irradiés en présence d'oxygène. Il n'y a pas de radiosensibilisation.

### D. — Conclusions.

Ces résultats démontrent que la radiosensibilité de l'ébauche frontale et des ébauches oculaires d'un embryon de Poulet augmente au fur et à mesure que la proportion d'oxygène ambiante augmente. Le mécanisme impliqué par ce phénomène n'est pas forcément le même que le mécanisme d'action des substances radioprotectrices.

Si le phénomène d'augmentation de la radiosensibilité en présence d'$O_2$ a été démontré d'une façon assez générale, par contre, il n'existe que peu de substances chimiques exerçant la même action. Mitchell (1949) a montré que le synkavit (sel tétrasodique du diphosphate de 2-méthyl-1 : 4-naphtohydroquinone) sensibilise les tumeurs humaines aux rayons X. Hagen et Koch (1956) montrent que l'iodoacétate est sensibilisateur. L'oxyde nitrique, en absence d'$O_2$, sensibilise les Bactéries à l'action des rayons X (Howard-Flanders, 1957). Des Poissons irradiés dans 25 0/0 d'eau lourde sont plus radiosensibles (Haggqvist, Hevesy, 1958). Nous allons voir au chapitre suivant les résultats obtenus avec quelques substances fortement oxydantes.

## X. — Sensibilisation au bleu de méthylène.

Nous avons montré au chapitre II que le bleu de méthylène à l'état réduit se comportait comme un radioprotecteur, il était, dès lors, tentant de se demander s'il ne pouvait pas avoir un effet radiosensibilisateur à l'état oxydé. Nous avons entrepris une série d'expériences destinées à répondre à cette question.

La technique est la suivante : on fait une injection de Bm à 1/1.000 soit $\frac{M}{373{,}9}$ dans les conditions qui ont été exposées au chapitre II et 1 heures après, on irradie l'embryon avec une dose donnant moins de 100 0/0 de cyclocéphales et correspondant à 3.000 r.

TABLEAU XXXV

*Résultats d'expériences de sensibilisation au bleu de méthylène.*

| | $\frac{Bm}{1.000}$ + 3.000 r | | | Témoins 3.000 r | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Morts | | | 60 | | | 8 |
| Cyclocéphales anophtalmes | | | 36 | | | 33 |
| Pas d'yeux, petit bec | 9 | 9 | | 6 | 7 | |
| Pas d'yeux, bec normal | 0 | | | 1 | | |
| 1 œil gauche, bec normal | 1 | | | 1 | | |
| 1 œil gauche, bec réduit | 2 | 9 | 18 | 0 | 11 | 18 |
| Petits yeux, petit bec | 4 | | | 8 | | |
| 1 œil gauche, pas de bec | 2 | | | 1 | | |
| Normal | 0 | | | 1 | | |
| Total | | | 114 | | | 59 |

*Résultat.*

On voit que la proportion de cyclocéphales est la même chez les embryons traités au bleu de méthylène (36/54 = 67 0/0) et chez les témoins (33/51 = 65 0/0). L'augmentation n'est pas du tout significative et on ne peut pas dire que le bleu de méthylène sensibilise l'embryon à l'action tératogène des rayons X.

En ce qui concerne l'anophtalmie, le résultat est semblable, la proportion d'anophtalmes passe de 78 0/0 (40/51) chez les témoins, à 83 0/0 (45/54) chez les embryons traités ; l'augmentation n'est pas significative.

Seule la mortalité est beaucoup plus importante chez les traités (60/114 = 53 0/0) que chez les témoins (8/59 = 14 0/0).

Le bleu de méthylène, à l'état oxydé, est donc inapte à sensibiliser l'embryon de Poulet à l'action tératogène des rayons X.

## XI. — **Sensibilisation au permanganate.**

Dans la série des corps fortement oxydants, nous avons essayé l'effet du permanganate de potassium, pour tenter d'obtenir une sensibilisation analogue à celle obtenue avec l'oxygène.

Le permanganate a été utilisé exactement dans les mêmes conditions que le bleu de méthylène. Injecté en solution à 1/1.000, soit $\frac{M}{158}$, à l'embryon, il donne une mortalité de 12/23, les 11 survivants étant normaux. La mort survient par arrêt immédiat du cœur lorsque le permanganate diffuse vers le cœur. Le permanganate se décolore très rapidement (quelques secondes). Du point de vue de la radiosensibilisation, nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau XXXVI

*Résultats d'expériences de radiosensibilisation au permanganate.*

| | $MnO_4K$ + 3.000 r | | | Témoins 3.000 r | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Morts | | 66 | | | 8 | |
| Cyclocéphales | | 27 | | | 33 | |
| Petits yeux, petit bec | 4 | | | 11 | | |
| 1 œil droit, pas de bec | 1 | 6 | 8 | | | 18 |
| Petits yeux, bec normal | 1 | | | | | |
| Pas d'yeux, petit bec | | 2 | | 7 | | |
| Total | | 101 | | | 59 | |

La proportion de cyclocéphales passe de 65 0/0 (33/51) chez les témoins, à 77 0/0 (27/35) chez les embryons traités au permanganate ; l'augmentation est plus forte que dans le cas du bleu de méthylène, mais elle n'est pas significative, $p = 0{,}22$. La mortalité est du même ordre (66 0/0).

En ce qui concerne l'anophtalmie, elle passe de 78 0/0 (40/51) chez les témoins, à 83 0/0 (29/35), comme dans le cas du bleu de méthylène.

Il est donc possible qu'il y ait un léger effet sensibilisateur de ces solutions, puisque les déviations sont toujours dans le même sens, mais il n'est pas mesurable. Peut-être à cause de la très forte mortalité, due à une grande toxicité de ces substances.

*DEUXIÈME PARTIE*

# RADIOPROTECTION *IN VITRO*

## INTRODUCTION ET HISTORIQUE

Les phénomènes de radioprotection, si largement étudiés depuis quelques années sur l'animal, n'ont suscité, par contre, qu'un nombre restreint de travaux sur des cellules ou des organes en culture. Il faut citer, cependant, les travaux de Nizet, Bacq et Herve (1952) qui ont montré que le pyruvate et la cystéamine protègent les réticulocytes du sang de Chien cultivés *in vitro*, contre le blocage de leur maturation par les rayons X (100.000 à 200.000 r). D'après Trabert van der Maesen (1957), la cystéamine n'exerce aucune protection sur des fibroblastes et des myoblastes d'embryon de Poulet ou de Souris cultivés en goutte pendante et irradiés (400 à 750 r). Il convient cependant de signaler que dans ces expériences, la cystéamine s'est révélée beaucoup plus toxique que celle utilisée en 1953 dans le même laboratoire. On sait en effet, que la toxicité de la cystéamine peut varier énormément d'un échantillon à l'autre. Oftedal, Oftebro et Ecker (1958) ont montré que la cystamine protège la survie et la croissance des fibroblastes de cœur d'embryon de Poulet cultivés en flacon de Carrel ou en goutte pendante, contre les rayons X (1.500 à 2.000 r). La cystéine et la cystéamine sont inefficaces.

En ce qui concerne l'anoxie, Trowell (1953) a montré que la radiosensibilité des ganglions lymphatiques du Rat, cultivés *in vitro*, varie dans la proportion de 1 à 12 lorsque la concentration en $O_2$ dissous varie de 0 à 22 millilitres/litre, en comptant le nombre de pycnoses 5 heures après une irradiation de 278 r. Les lymphocytes sont aussi 11 fois moins sensibles *in vitro* que *in vivo*. Dewey (1960) a montré que la viabilité des cellules de foie humain est 2,2 fois plus grande après irradiation si elles sont cultivées en atmosphère d'azote pur. L. Weiss (1960) a montré que l'hypoxie diminue la radiosensibilité des cellules HeLa en culture. Robinson et Revesz (1961) ont montré que les cellules ascitiques cultivées *in vitro*, sont 3,5 fois moins radiosensibles en atmosphère d'azote que dans l'air.

Nous avons entrepris une série d'expériences pour savoir si les phénomènes de radioprotection démontrés sur l'embryon de Poulet pouvaient être mis en évidence, avec les mêmes substances, sur un organe de Poulet cultivé selon la méthode de culture organotypique de Wolff et Haffen. Les résultats sont exposés au chapitre II.

## CHAPITRE PREMIER

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### I. — Choix des organes et technique de culture.

Parmi les nombreux organes de l'embryon de Poulet susceptibles d'être cultivés, nous avons choisi les testicules et l'intestin de l'embryon de 10 jours d'incubation. Ce sont en effet des organes faciles à cultiver pen-

dant 10 à 15 jours. Ils présentent chacun un test de différenciation très caractéristique si on les observe en coupe microscopique. Le testicule, d'une part, différencie dans sa médullaire des cordons testiculaires caractéristiques ; l'intestin, d'autre part, différencie des structures en forme de villosité, recouvertes d'un épithélium à une ou plusieurs assises cellulaires. L'intestin présente d'autre part l'avantage de montrer, en culture, d'abondants mouvements péristaltiques, faciles à observer.

Ces organes sont cultivés selon la méthode de Ét. Wolff et K. Haffen (1951), sur milieu solide composé de la manière suivante :

| | |
|---|---|
| Solution de gélose à 1 0/0 dans le liquide de Gey | 6 volumes |
| Liquide de Tyrode | 3 volumes |
| Jus d'embryon dilué de moitié dans le liquide de Tyrode | 3 volumes |

Le milieu est coulé dans un récipient de culture en forme de « salière », refermé par un couvercle de verre luté à la paraffine. L'organe se nourrit des substances du milieu par sa surface inférieure et respire l'air ambiant par sa surface supérieure. Il peut être observé quotidiennement de l'extérieur. Il est maintenu en couveuse à 38°5.

Les *testicules* se présentent sous la forme d'organes allongés et bombés, d'aspect blanchâtre sur le milieu de culture. Ils se cultivent facilement une quinzaine de jours.

Les *intestins* se présentent sous la forme d'un cylindre allongé, de plusieurs centimètres de long. Ils sont débités en morceaux plus petits pour la culture. Ils ont un aspect translucide, la lumière centrale est visible lorsqu'elle contient de la bile. Les villosités intestinales lui donnent un aspect strié longitudinalement.

Pendant toute la durée de la culture, l'intestin présente des mouvements intenses, de différentes natures :

a) *Mouvements péristaltiques :* ce sont des constrictions qui apparaissent en un point quelconque du tube et qui se déplacent dans un sens ou dans l'autre à faible vitesse. Ces mouvements sont désordonnés, il peut y en avoir plusieurs, dans des directions quelconques, sur le même explant.

b) *Mouvements de brassage :* ce sont des constrictions qui apparaissent en différents endroits du tube intestinal et qui disparaissent sans se déplacer.

c) *Mouvements d'enroulement :* ce sont des mouvements imperceptibles qui affectent l'ensemble de l'organe en son milieu et qui font qu'un morceau de tube rectiligne peut être retrouvé, 24 ou 48 heures après, complètement enroulé sur lui-même en spirale.

Les intestins ainsi cultivés, peuvent survivre au moins 10 à 15 jours. Ils ne croissent pas, leur longueur a plutôt tendance à diminuer, mais ils poursuivent leur différenciation par augmentation du nombre et du relief des villosités.

## II. — Technique d'imprégnation.

L'imprégnation par la substance radioprotectrice utilisée se fait sur le milieu de culture. Quelques gouttes de la solution sont déposées à la surface du milieu, de façon que l'organe soit entièrement immergé. Quatre heures après, l'organe est placé sur un milieu frais. La seule variable est la concentration de la solution utilisée.

## III. — Technique d'irradiation.

### 1) *En salière.*

Les organes sont irradiés sur leur milieu de culture. Le couvercle de verre est remplacé par une membrane de cellophane lutée à la vaseline. L'irradiation est faite à feu nu, sans localisateur, à une distance de 11 centimètres. Le débit est de 1.600 r/minute. Après l'irradiation, l'organe est replacé sur un milieu frais.

### 2) *En atmosphère gazeuse.*

La technique d'irradiation en atmosphère gazeuse est inspirée des expériences faites *in vivo*. Un petit récipient en verre (fig. 19) muni de 2 tubulures renferme un milieu de culture coulé dans un verre de montre. Le fond du récipient est garni de

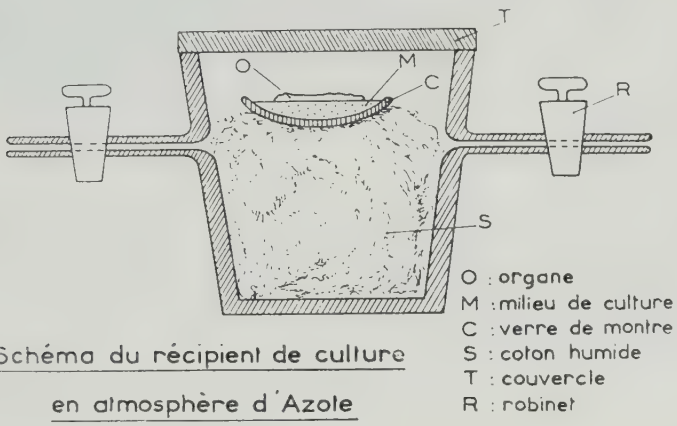



Fig. 19. — Schéma de l'appareil à irradiation en atmosphère gazeuse, pour les cultures d'organes.

coton humide pour éviter le dessèchement de l'atmosphère. Pendant l'irradiation, le couvercle de verre est remplacé par une feuille de cellophane. Après l'irradiation, les organes sont replacés en salière, sur un milieu frais.

## IV. — Processus expérimental.

Le processus expérimental pratique sera donc le suivant :

### 1) *Intestin.*

La grande anse intestinale d'un embryon de Poulet de 10 jours d'incubation est prélevée sur toute sa longueur (environ 3 centimètres) et découpée en 4 parties égales ainsi réparties (fig. 20).

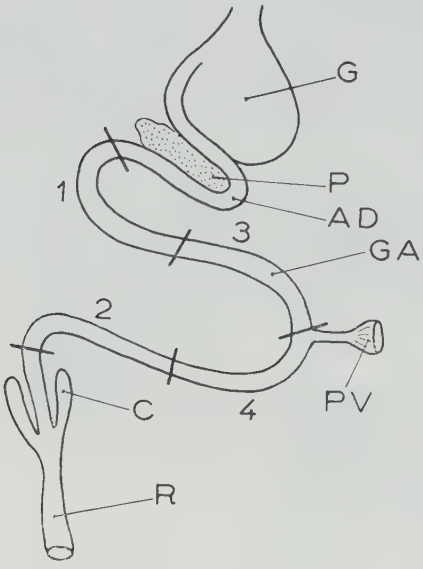



Fig. 20. — Schéma d'un intestin de Poulet de 10 jours d'incubation, avec indication du découpage des différentes parties (1, 2, 3, 4). *G*, gésier ; *P*, pancréas ; *AD*, anse duodénale ; *GA*, grande anse intestinale ; *PV*, pédicule vitellin ; *C*, cæcum ; *R*, rectum.

*Partie 1 :* cultivée comme témoin.

*Partie 2 :* soumise à la seule action du traitement radioprotecteur.

*Partie 3 :* soumise à la seule action du traitement aux rayons X.

*Partie 4 :* soumise successivement au traitement radioprotecteur et aux rayons X.

Les parties 3 et 4 sont choisies dans la région moyenne de la grande anse.

En faisant varier d'une part la concentration de la substance radioprotectrice, d'autre part la dose de rayons X et enfin le temps de latence entre les deux traitements, on compare les parties 3 et 4 tout au long de la culture. Le traitement sera considéré comme radioprotecteur si la partie 4 est en meilleur état que la partie 3 après un certain temps de culture (8 jours en général). Deux tests sont utilisés pour reconnaître l'état de la culture.

a) *Aspect macroscopique :* aspect extérieur général de l'organe, dimensions, mouvements péristaltiques, coloration.

b) *Aspect microscopique :* des coupes histologiques de quelques explants sont colorées et examinées au microscope de façon à reconnaître la santé des différents tissus et l'aspect des villosités.

### 2) *Testicules.*

Le processus expérimental est le même en ce qui concerne les testicules. On prélève les 4 testicules de 2 embryons de 10 jours d'incubation. Les 2 testicules d'un même embryon subissent les traitements correspondant à ceux des parties 3 et 4 de l'intestin, les 2 testicules de l'autre sont soumis aux mêmes conditions que les parties 1 et 2 de l'intestin. La méthode est ensuite exactement la même.

## CHAPITRE II

## RÉSULTATS

### I. — Action des rayons X.

Il n'est pas possible d'établir pour un organe en culture, comme on l'a fait pour une ébauche embryonnaire *in vivo*, la dose de rayonnement minimale suffisante pour obtenir 100 0/0 de nécrose chez les témoins. En effet, les explants ont une certaine durée de survie en culture, après quoi ils se nécrosent spontanément. Une irradiation aura pour effet de réduire ce temps de survie et de faire apparaître la nécrose, au bout d'un temps d'autant plus court que la dose de rayonnement sera plus grande. Nous serons donc amenés à définir une dose de rayons X donnant 100 0/0 de nécrose en un temps déterminé et l'on comparera les temps moyens de survie des irradiés et des protégés.

#### A. — Intestin.

Un intestin cultivé *in vitro* se présente sous la forme d'un cylindre allongé translucide. Quelque temps après une irradiation, on voit apparaître à sa surface un certain nombre de granulations saillantes qui lui font prendre un aspect tacheté caractéristique. Ces granulations sont opaques et correspondent à du matériel nécrosé éliminé par la surface de l'organe. L'intestin évolue ensuite, selon les cas, soit vers la pycnose totale accompagnée de raccourcissement et opacité complète, soit vers la cytolyse avec raccourcissement et ballonnement ; dans ce dernier cas, on observe en fin de culture une sorte de vésicule fermée aux deux extrémités, limitée par une membrane unistratifiée transparente et gonflée de liquide. Les deux processus peuvent aussi coexister sur le même intestin, à des niveaux différents.

Le tableau XXXVII donne le temps moyen de survie d'un intestin irradié, en fonction de la dose (fig. 21).

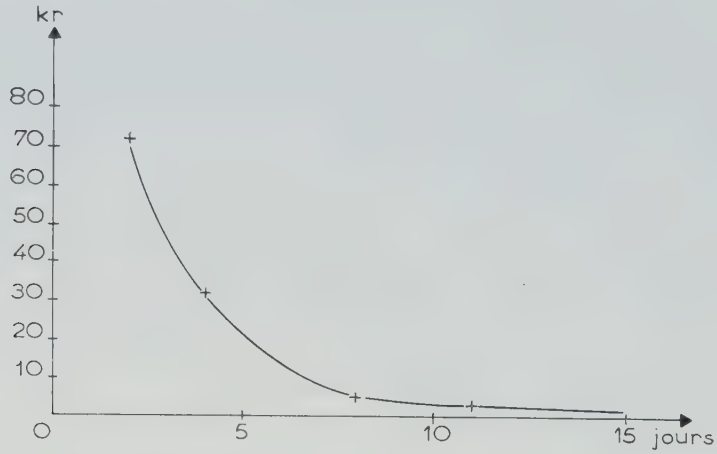



Fig. 21. — Courbe de survie d'un intestin irradié en culture, en fonction de la dose de rayonnement.

TABLEAU XXXVII

*Temps de survie d'un intestin irradié en culture suivant la dose d'irradiation.*

| Dose | Temps pour 100 0/0 de nécrose |
|---|---|
| 48.000 à 72.000 r | 2 à 3 jours |
| 32.000 r | 4 » |
| 4.800 r | 8 » |
| 3.200 r | 10 à 12 » |

— Quelle que soit la dose de rayonnement, dans les limites éprouvées, la nécrose n'est jamais totale avant les 48 heures qui suivent l'irradiation.

— En dessous de 3.000 r, la nécrose n'est pas plus rapide que chez les témoins.

— Une variation de dose ne fait pas varier l'aspect qualitatif des lésions, mais fait varier simplement leur vitesse d'apparition.

### B. — Testicules.

Le cas des testicules est légèrement différent. On n'observe, après l'irradiation, ni nécrose ni opacification, mais on voit l'explant se rétrécir, diminuer de volume et prendre la forme d'une bille au bout de quelques jours de culture. Il finit par disparaître comme s'il fondait à la surface

du milieu. On voit par ailleurs des éliminations de cellules nécrosées. Cet effet n'apparaît pas en dessous d'une dose de 800 r, il est d'autant plus rapide que la dose est plus forte. Quelle que soit la dose (jusqu'à 72.000 r), il faut au moins 48 heures pour le voir apparaître.

## II. — **Action de la cystéamine.**

### A. — Intestin.

#### 1) *Action de la cystéamine seule.*

La cystéamine a été utilisée en solution aqueuse, à des concentrations voisines de celles utilisées *in vivo*, en imprégnation pendant 4 heures. Les résultats sont les suivants :

Tableau XXXVIII

*Action de la cystéamine sur un intestin en culture.*

| | | |
|---|---|---|
| Solution à 1/200 | soit M/15,4 | nécrose en 3 à 5 jours de culture. |
| » 1/300 | soit M/23,1 | nécrose en 4 à 5 jours de culture. |
| » 1/400 | soit M/30,8 | nécrose en 6 à 8 jours de culture. |
| » 1/800 | soit M/61,6 | pas de nécrose avant 10 jours de culture. |
| » 1/1.000 | soit M/77 | pas de nécrose avant 10 jours de culture. |
| » 1/1.250 | soit M/96 | aucun effet visible. |
| » 1/2.000 | soit M/154 | aucun effet visible. |

Pour des concentrations supérieures à 1/800, on observe une nécrose assez rapide des explants. A partir de 1/800 au contraire, la nécrose n'apparaît jamais avant 8 jours et la plupart des organes se développent 10 à 15 jours normalement.

#### 2) *Expériences de radioprotection.*

a) *Première série expérimentale :* doses fortes de cystéamine et de rayonnement.

Le tableau suivant résume les résultats :

Tableau XXXIX

*Résultats d'expériences de protection d'un intestin en culture, par la cystéamine.*

| Concentration cystéamine | Dose de rayons X en r | Temps de latence entre cystéamine et irradiation | Résultat |
|---|---|---|---|
| $\frac{1}{200}$ | 32.000 | 4 heures | Tous nécrosés en 3 jours. |
| $\frac{1}{200}$ | 32.000 | 24 heures | Nécrose en 4 à 5 jours. |
| $\frac{1}{300}$ | 32.000 | 4 heures | Tous nécrosés en 4 jours. |
| $\frac{1}{400}$ | 32.000 | 4 heures | Nécrose en 5 jours. |
| $\frac{1}{400}$ | 32.000 | 24 heures | Nécrose en 3 jours. |
| $\frac{1}{1.000}$ | 24.000 | 4 heures | Nécrose en 5 jours. |

Nous sommes ici manifestement en dehors des limites d'efficacité du radioprotecteur, aucun phénomène sensible de radioprotection ne peut être mis en évidence.

b) *Deuxième série expérimentale :* doses faibles de cystéamine et de rayonnement.

Le tableau suivant résume les résultats :

Tableau XL

*Résultats d'expériences de protection d'un intestin en culture, par la cystéamine.*

| Nombre de cas | Concentration cystéamine | Dose de rayons X en r | Temps de latence entre cystéamine et irradiation | Résultat |
|---|---|---|---|---|
| 12 | $\frac{1}{800}$ | 8.000 | 4 heures | Retard de 24 heures à la nécrose. |
| 12 | $\frac{1}{800}$ | 4.800 | 4 heures | Retard de 3 à 10 jours à la nécrose. |
| 12 | $\frac{1}{1.250}$ | 4.000 | 4 heures | Retard de 2 à 3 jours à la nécrose. |
| 12 | $\frac{1}{2.000}$ | 4.800 | 4 heures | Retard de 1 à 2 jours à la nécrose. |

Nous avons ici, pour chaque dosage, un certain retard à la nécrose, le meilleur résultat étant obtenu pour une concentration de cystéamine de 1/800 et une irradiation de 4.800 r. Dans ce cas, sur 16 explants, 12 étaient encore en bon état au 8e jour et un intestin a vécu 21 jours, cependant que chez les témoins, 16 explants sur 16 étaient nécrosés au 8e jour. La cystéamine apporte donc ici une influence radioprotectrice faible, mais réelle sur l'intestin de Poulet.

### B. — Testicules.

#### 1) *Action de la cystéamine seule.*

Utilisée dans les mêmes conditions que pour l'intestin, la cystéamine nous a donné des résultats analogues du point de vue de sa toxicité. C'est à partir d'une solution à 1/800 que l'on peut obtenir une survie de 10 à 15 jours. Pour des solutions plus concentrées, la nécrose apparaît beaucoup plus rapidement. Des solutions plus diluées n'ont aucun effet apparent.

#### 2) *Expériences de radioprotection.*

Nous avons repris, avec les testicules, les séries expérimentales faites avec l'intestin. Le seul résultat positif que nous ayons enregistré a été obtenu pour une imprégnation de cystéamine à 1/800 et une irradiation de 800 r appliquée 4 heures après. Dans la moitié des cas environ (7 sur 16), la structure et la forme du testicule sont maintenues, alors que tous les témoins se nécrosent.

Il s'agit ici d'un cas limite, puisque nous avons combiné la dose de cystéamine maximum et la dose de rayons X minimum, mais c'est le seul cas où l'on obtienne quelques résultats.

Le testicule est donc un organe peu susceptible d'être protégé, en culture, par la cystéamine.

### III. — Action du bleu de méthylène.

A l'image des expériences entreprises sur l'embryon, le bleu de méthylène a été essayé sur une culture, après qu'il eût été réduit par l'organe lui-même. L'expérience est ainsi réalisée. L'intestin est imprégné pendant 4 heures dans une solution de bleu de méthylène, puis il est replacé sur un milieu frais. Quatre à six jours plus tard, suivant la concentration de la solution, les organes se trouvent décolorés. On effectue alors l'irradiation.

Un testicule traité de la même manière, ne décolore pas le bleu de méthylène, nous avons donc renoncé à cette méthode pour le testicule.

### A. — Effet du bleu de méthylène seul.

Les concentrations suivantes ont été utilisées.

Tableau XLI

*Action du bleu de méthylène sur l'intestin en culture.*

| | |
|---|---|
| — Solution à 1/1.000, soit M/ 373,9 | Mauvaise culture, rétrécissement de l'organe et nécrose en 10 à 15 jours (8 cas). |
| — Solution à 1/2.000, soit M/ 747,8 | Certains explants sont en bon état, d'autres se rétrécissent en 10 à 15 jours (10 cas). |
| — Solution à 1/4.000, soit M/1.495,6 | La plupart des explants survivent normalement 15 à 20 jours (12 cas). |

Ce sont ces concentrations qui serviront aux expériences de radioprotection.

### B. — Expériences de radioprotection.

Ces expériences demandent une culture d'environ 15 jours (4 à 6 jours de décoloration et 7 à 8 jours de culture après l'irradiation), ce qui est la limite d'une bonne culture. Les résultats sont groupés dans le tableau suivant :

Tableau XLII

*Résultats d'expériences de protection de l'intestin en culture, par le bleu de méthylène.*

| Concentration de bleu de méthylène | Temps de décoloration | Dose de rayons X en r | Temps de culture après irradiation | Résultat |
|---|---|---|---|---|
| $\frac{1}{1.000}$ | 6 jours | 4.800 | 7 jours | Aspect normal, mais pas de mouvements (12/18). *Témoins irradiés :* nécrosés (15/18). |
| $\frac{1}{2.000}$ | 5 jours | 4.800 | 7 jours | Aspect normal, quelques mouvements (8/15). *Témoins irradiés :* cytolysés (10/15). |
| $\frac{1}{4.000}$ | 4 jours | 6.400 | 7 jours | État normal (17/22). *Témoins irradiés :* nécrosés (20/22). |

Le meilleur résultat est obtenu pour une imprégnation de bleu de méthylène à 1/4.000 et une irradiation de 6.400 r. En effet, dans ce cas,

18 explants sur 22 sont en bon état et présentent des mouvements, alors que tous les témoins irradiés sont en voie de nécrose.

La protection est ici meilleure que celle obtenue avec la cystéamine. La méthode, par contre, est inefficace pour les testicules.

### C. — Expériences complémentaires.

#### 1) *Imprégnation après l'irradiation.*

On procède de la manière suivante : l'intestin est irradié à 6.400 r immédiatement après l'explantation, puis plongé pendant 4 heures dans une solution de bleu de méthylène à 1/4.000. Il est ensuite lavé et cultivé sur un milieu frais. Les résultats sont les suivants :

Deux jours après ces traitements, les explants sont tous décolorés et présentent les premiers signes macroscopiques d'action des rayons X, alors que les témoins imprégnés mais non irradiés sont encore tout bleus. La nécrose apparaît ensuite au bout de 6 à 8 jours, comme chez les témoins. On peut donc en déduire que :

*a*) le traitement au bleu de méthylène après l'irradiation n'a aucun effet radio-réparateur ;

*b*) un intestin irradié décolore le bleu de méthylène deux fois plus rapidement qu'un intestin normal.

#### 2) *Irradiations 4 heures après l'imprégnation.*

Si les intestins sont irradiés immédiatement après le bain de bleu de méthylène c'est-à-dire 4 heures après le début de l'imprégnation, on ne peut mettre en évidence aucun phénomène de radioprotection. Il est donc nécessaire que le bleu soit réduit à l'état de leucodérivé au moment de l'irradiation pour qu'il exerce une action radioprotectrice.

### D. — Conclusion.

Il ressort de cette série expérimentale que le bleu de méthylène, réduit à l'état de leucodérivé par l'organe lui-même, est un bon radioprotecteur de l'intestin d'embryon de Poulet en culture d'organes. Cet effet est probablement dû à une baisse de tension d'oxygène dans l'organe lui-même.

Il est curieux de constater, d'autre part, qu'un intestin irradié réduit plus rapidement le bleu de méthylène qu'un intestin normal, alors que ce phénomène ne se produit pas si on irradie un intestin déjà imprégné de bleu.

## IV. — Anoxie.

L'anoxie, qui s'est montrée très efficace contre l'action des rayons X *in vivo*, a été essayée, dans des conditions analogues, sur des organes embryonnaires cultivés *in vitro*. La technique d'incubation a été indiquée ci-dessus, les résultats figurent ci-dessous.

## A. — Incubation en atmosphère d'azote.

### 1) *Intestin.*

a) *Effet de l'azote seul.*

Différents essais ont été faits, à température ordinaire et en couveuse, pour savoir combien de temps l'intestin de Poulet pouvait supporter l'asphyxie en culture. Les résultats sont donnés par le tableau suivant :

Tableau XLIII

*Action d'une atmosphère d'azote sur l'intestin en culture.*

| Temps d'asphyxie | Température | Résultat |
|---|---|---|
| 2 h. 30 | 38° C | Bonne survie pendant 10 à 19 jours. |
| 4 heures | 38° C | Bonne survie pendant 10 à 19 jours. |
| 10 heures | 38° C | Bonne survie pendant 10 jours. |
| 17 heures à 21 heures | 20° C | Bonne survie pendant 10 jours. |
| 24 heures | 38° C | Opacification en 24 heures, aspect laiteux après 48 heures, nécrose complète en 7 jours. |

On voit que les intestins supportent une asphyxie de 10 heures à 38° C ou de 21 heures à 20° C. Au-delà de ces temps, la nécrose apparaît assez rapidement.

b) *Expériences de radioprotection.*

Conduites de la manière habituelle, avec des durées d'asphyxie variables, les expériences ont donné les résultats suivants :

Tableau XLIV

*Résultats d'expériences de protection de l'intestin en culture par une atmosphère d'azote.*

| Temps d'asphyxie | Température d'incubation | Dose de rayons X | Résultats 8 jours après | Résultats 10 jours après |
|---|---|---|---|---|
| 4 heures | 38° | 6.400 r | 18/32 protégés, témoins irradiés 18/20 nécrosés | Tous nécrosés |
| 21 heures | 20° | 6.400 r | 7/8 protégés, témoins 5/6 nécrosés. | |
| 10 heures | 38° | 6.400 r | 20/42 protégés, témoins 20/20 nécrosés. | |

On peut noter, d'après ce tableau, que l'anoxie détermine environ 50 0/0 de protection au bout de 8 jours de culture. On observe à ce moment-là des lésions moins nombreuses et moins accentuées. Cependant, la plupart des intestins protégés se nécrosent au bout de 10 à 15 jours, ce qui indique un simple retard à la nécrose de 2 à 7 jours.

Si les intestins sont mis en asphyxie pendant 10 heures à 38° *après* une irradiation de 6.400 r, tous les organes sont nécrosés en 8 jours. L'asphyxie n'apporte donc aucune radioréparation.

### 2) *Testicules.*

Les testicules d'embryon de Poulet soumis au même traitement dans les mêmes conditions expérimentales, n'ont montré aucun effet de radioprotection.

### B. — Incubation en atmosphère d'hydrogène.

Employé seul, l'hydrogène asphyxie les organes dans les mêmes conditions que l'azote et les expériences, conduites de la même manière, ont donné des résultats analogues :

Tableau XLV

*Résultats d'expériences de protection de l'intestin en culture, par une atmosphère de $H_2$.*

| Temps d'asphyxie | Température d'incubation | Dose de rayons X | Résultats 8 jours après |
|---|---|---|---|
| 4 heures | 38° | 6.400 r | Tous nécrosés. |
| 17 heures | 20° | 6.400 r | 7/13 protégés (Témoins irradiés : 8/8 nécrosés). |
| 10 heures | 38° | 4.800 r | 15/31 protégés (Témoins irradiés : 15/16 nécrosés). |

On voit apparaître ici des résultats semblables à ceux que donne une atmosphère d'azote. Environ 50 0/0 des intestins asphyxiés montrent un retard à la nécrose de quelques jours, dans les meilleures conditions. Ce phénomène n'est pas observé si l'hydrogène est donné après l'irradiation. Les testicules, d'autre part, sont insensibles à ce traitement.

## V. — Sensibilisation.

L'anoxie s'étant montrée radioprotectrice, on pouvait se demander si, comme dans les expériences réalisées sur l'embryon, l'hyperoxie serait radiosensibilisatrice en culture. La technique employée est la même que

ci-dessus, mais le gaz utilisé est de l'oxygène. La dose d'irradiation est choisie de façon que les organes soient peu ou pas lésés par les rayons X. Les expériences préliminaires ont montré que la culture en atmosphère d'oxygène pendant 24 heures ne présente aucun inconvénient pour la survie.

Les expériences, conduites de la façon habituelle, ont donné les résultats suivants :

Tableau XLVI

*Résultats d'expériences de sensibilisation de l'intestin en culture, par une atmosphère d'$O_2$.*

| Temps d'hyperoxie | Dose de rayons X | Résultats 8 jours après |
|---|---|---|
| 4 heures | 3.200 r | Aucune sensibilisation. |
| 20 heures | 3.200 r | Aucune sensibilisation. |
| 20 heures | 1.600 r | 16/16 nécrosés (Témoins irradiés : 4/16 nécrosés). |

On voit que pour une dose donnant très peu de nécrose chez les témoins, on peut obtenir la nécrose de tous les intestins irradiés en présence d'oxygène pur. Ce résultat n'est observé que pour des doses voisines du seuil d'action des rayons X.

Ici encore, les testicules n'ont montré aucun effet appréciable de radiosensibilisation.

## VI. — **Observations microscopiques.**

Un certain nombre d'organes irradiés, protégés, ou sensibilisés, ont été soumis à un examen microscopique, dans le but de connaître plus précisément le comportement des différents tissus soumis à ces traitements. Les pièces ont été fixées au liquide de Bouin, coupées à 5 $\mu$ et colorées à l'hématoxyline de Groat.

### A. — Testicules.

1) Un testicule d'embryon de Poulet de 10 jours d'incubation, irradié à 800 r et cultivé 17 jours, se présente (fig. 22) sous la forme d'une masse arrondie et désorganisée. Les cellules ne montrent pas de pycnoses, mais l'aspect malsain d'un tissu en voie de dégénérescence. Il n'y a pas de cordons testiculaires ni aucune organisation visible. On observe peu de mitoses et peu de gonocytes.

2) Un testicule soumis au même traitement, mais protégé par une

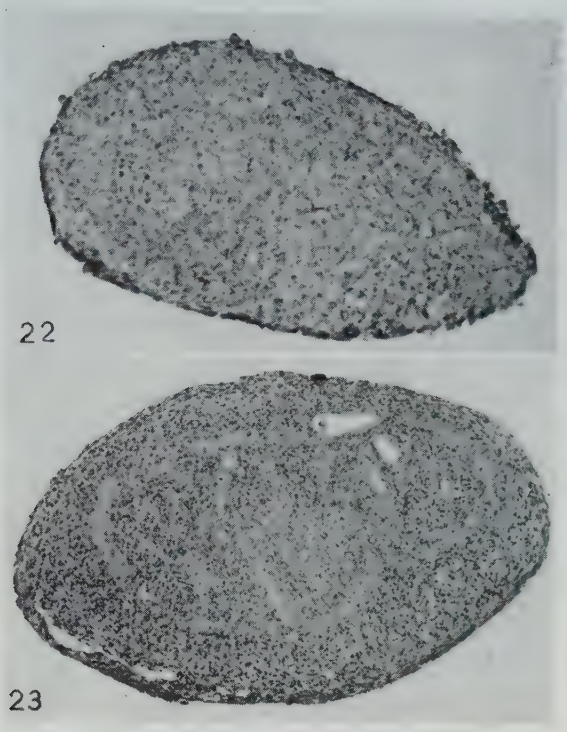



Fig. 22. — Testicule irradié (800 r) et cultivé 17 jours.
Tissu désorganisé, en voie de dégénérescence (× 180).

Fig. 23. — Testicule protégé par la cystéamine, irradié (800 r) et cultivé 17 jours.
Tissu sain et organisé en cordons testiculaires (× 107).

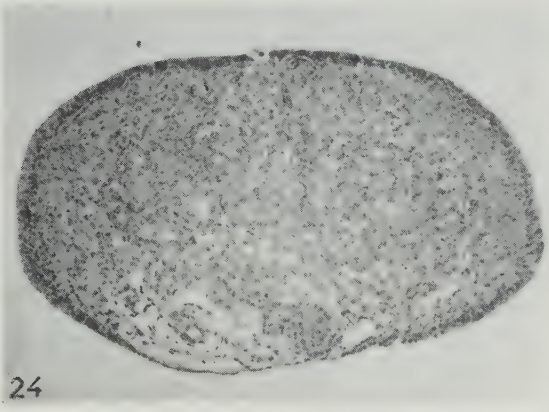



Fig. 24. — Testicule normal cultivé 17 jours.
Tissu sain et organisé en cordons testiculaires (× 140).

imprégnation préalable de cystéamine à 1/800 (fig. 23) montre, après 17 jours de culture, un tissu d'aspect beaucoup plus sain. Il n'y a aucun signe de dégénérescence, la médullaire est organisée en cordons testiculaires ; on voit quelques mitoses et de rares gonocytes. L'image se rapproche beaucoup d'une figure normale (fig. 24).

### B. — Intestin.

Si l'on coupe transversalement un intestin normal d'embryon de Poulet au 10e jour de l'incubation, on reconnaît au microscope un tube composé, de l'extérieur vers l'intérieur, d'une membrane séreuse, d'une couche

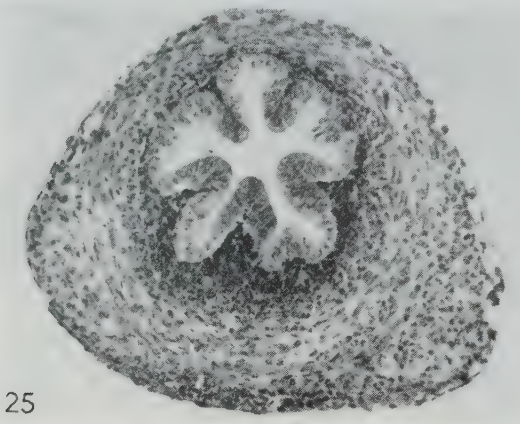



Fig. 25. — Intestin normal cultivé 11 jours (× 200).

de mésenchyme, de deux couches musculaires, une circulaire et une longitudinale, et d'un épithélium interne présentant 4 ou 5 villosités.

Après 10 à 15 jours de culture (fig. 25), cet intestin ne s'est pas allongé, mais il a poursuivi sa différenciation, surtout en ce qui concerne l'épithélium interne qui a accru le nombre de ses villosités et augmenté en épaisseur.

1) Si l'on considère un tel intestin, cultivé 8 à 15 jours après une irradiation de 3.200 à 6.400 r, deux types d'évolution peuvent se produire, parfois même simultanément sur 2 régions du même organe :

*a*) ou bien il évolue vers la nécrose complète (fig. 28, 32). Dans ce cas, on observe une lumière réduite, remplie de débris cellulaires et bordée d'un épithélium mince et indifférencié. Tout le reste de la masse tissulaire, jusqu'à la séreuse, est complètement nécrosé et rempli de noyaux pycnotiques,

*b*) ou bien il évolue vers la cytolyse complète (fig. 26, 30). Dans ce cas on observe un épithélium interne plus ou moins sain en apparence, très

distendu, jusqu'à former une sorte de ballon rempli de liquide. La partie musculaire et mésenchymateuse a plus ou moins complètement disparu et l'épithélium vient s'accoler contre la séreuse en maints endroits.

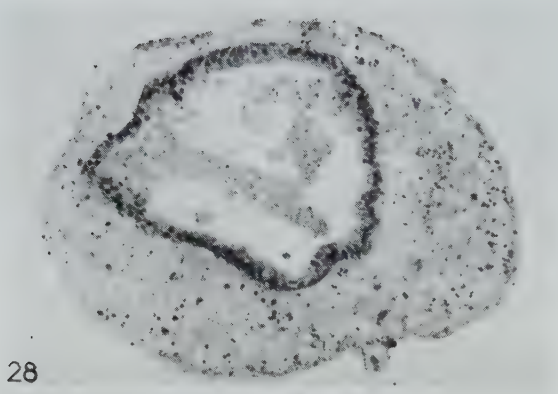
2) Les intestins protégés, soit par la cystéamine, soit par le bleu de méthylène, montrent au contraire un aspect sain et bien différencié de l'épithélium interne. On voit que son épaisseur a augmenté, ainsi que le nombre de ses villosités ; on aperçoit quelques mitoses. L'ensemble paraît

Fig. 26. — Intestin irradié (4.000 r) et cultivé 9 jours. Cytolyse des couches musculaires et mésenchymateuse, épithélium unistratifié, pas de villosité (× 128).

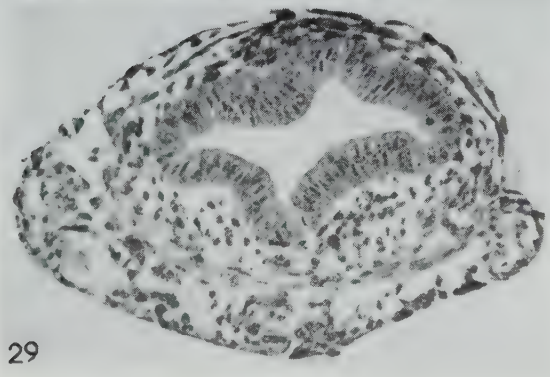
Fig. 27. — Intestin protégé par la cystéamine, irradié (4.000 r) et cultivé 9 jours. Couches musculaires en grande partie nécrosées, épithélium structuré en villosités (× 160).

sain et structuré (fig. 27, protégé à la cystéamine ; fig. 29, 31, protégés au bleu de méthylène).

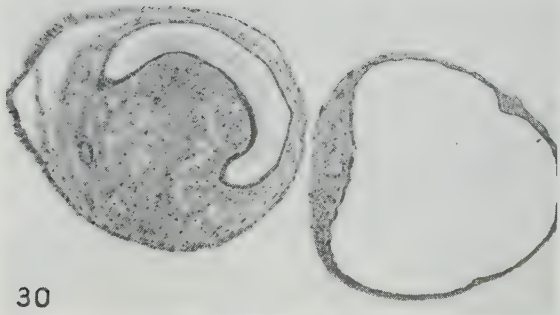
Il n'en va pas de même de la partie musculaire et mésenchymateuse qui, sans présenter l'aspect nécrosé des témoins, est cependant très réduite en épaisseur et de structure lâche (fig. 27).



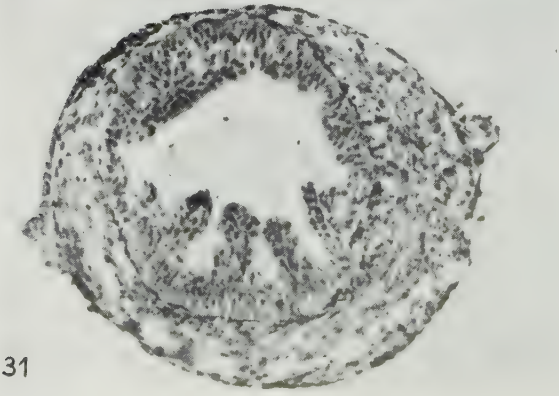
28



29



30



31

Les mêmes remarques sont à faire pour un intestin protégé par l'azote (fig. 33), quoi qu'il soit moins bien protégé que les précédents.

3) Si l'on compare, maintenant, un intestin sensibilisé par une atmosphère d'oxygène (fig. 34), à un intestin témoin irradié à 1.600 r (fig. 35),

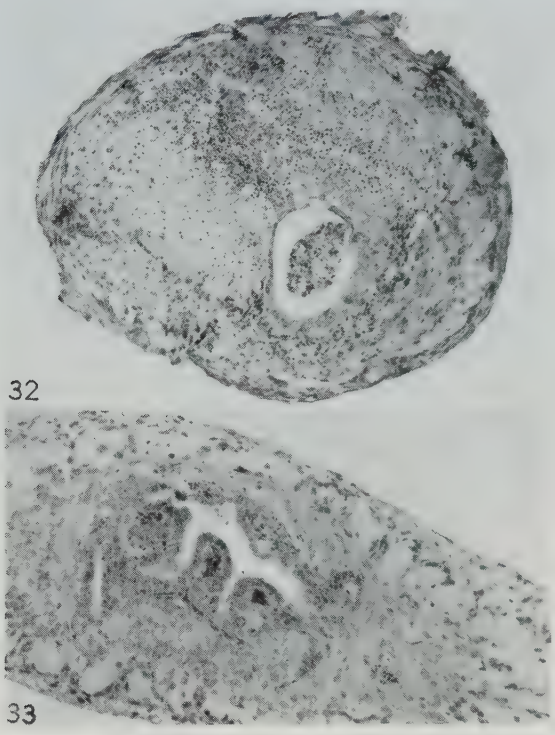



Fig. 32. — Intestin irradié (6.400 r) et cultivé 9 jours. Nécrose complète (× 107).

Fig. 33. — Intestin protégé par une incubation en atmosphère d'azote, irradié (6.400 r) et cultivé 9 jours. Peu de nécrose, villosités épithéliales (× 128).

Fig. 28. — Intestin irradié (4.800 r) 5 jours après l'explantation et fixé au 13e jour de la culture. Nécrose totale (× 160).

Fig. 29. — Intestin protégé par le bleu de méthylène, irradié (4.800 r) 5 jours après l'explantation et fixé au 13e jour de la culture. Aspect sain, épithélium pluristratifié (× 214).

Fig. 30. — Intestin irradié (3.200 r) 5 jours après l'explantation et fixé au 11e jour de la culture. Nécrose et cytolyse, épithélium unistratifié (× 63).

Fig. 31. — Intestin protégé par le bleu de méthylène, irradié (3.200 r) 5 jours après l'explantation et fixé au 11e jour de la culture. Epithélium pluristratifié et structuré en villosités (× 170).

on peut faire des remarques analogues : l'intestin sensibilisé présente de nombreuses pycnoses dans les couches musculaires et mésenchymateuses, alors que l'épithélium interne ne se différencie pas. L'intestin témoin, au contraire, montre peu de pycnoses et un épithélium interne différencié avec de nombreuses villosités.

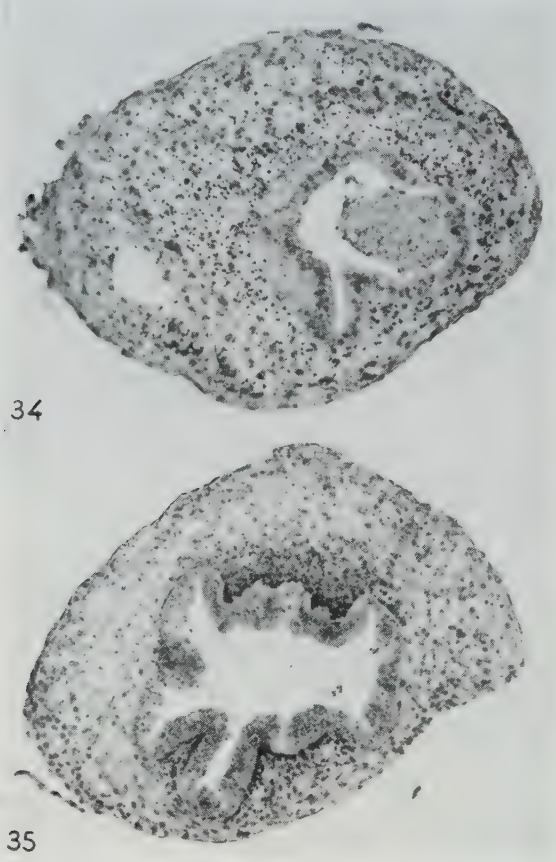



Fig. 34. — Intestin sensibilisé par une atmosphère d'oxygène, irradié (1.600 r) et cultivé 10 jours. Nombreuses pycnoses dans les couches musculaires (× 170).

Fig. 35. — Intestin irradié (1.600 r) et cultivé 10 jours. Peu de pycnoses, épithélium pluristratifié (× 140).

### C. — Conclusion.

Ces résultats montrent que le phénomène de radioprotection, observé macroscopiquement sur certains organes d'embryon de Poulet en culture *in vitro*, possède un support structural défini au niveau des tissus et reconnaissable à l'observation microscopique.

En ce qui concerne les testicules, la structure en cordons est, au moins partiellement, conservée ; il y a quelques gonocytes et quelques mitoses.

En ce qui concerne l'intestin, l'épithélium interne est l'élément structural le mieux protégé, c'est lui qui conserve la forme de l'organe. Les couches musculaires sont beaucoup moins bien protégées, mais non totalement supprimées en général, puisqu'il se conserve souvent une certaine motilité.

Il faut remarquer, cependant, que les différents radioprotecteurs utilisés dans ce travail, sont beaucoup moins efficaces en culture *in vitro*, que sur l'animal entier. L'anoxie, en particulier, qui est d'une très grande efficacité sur l'embryon, a un effet beaucoup moins sensible en culture. La raison en est, vraisemblablement, que l'organe cultivé, même s'il survit dans de bonnes conditions, a une respiration moins intense et un métabolisme plus faible que dans l'organisme. La différence d'intensité respiratoire, lorsque l'on passe d'une atmosphère aérée à une atmosphère d'azote, sera donc moins grande *in vitro* que *in ovo*. La différence de radiosensibilité est donc aussi réduite.

*TROISIÈME PARTIE*

# ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES ACIDES NUCLÉIQUES

## INTRODUCTION

On sait depuis les premiers travaux de A. H. Sparrow et F. M. Rosenfeld (1946) que l'ADN en solution aqueuse subit une chute de viscosité après irradiation. Cet effet se prolonge ensuite pendant quelques heures après la cessation de l'irradiation (B. Taylor, J. P. Greenstein, A. E. Hollaender, 1948). Depuis, l'on s'est beaucoup intéressé à l'action des rayons X sur les acides nucléiques et aux facteurs qui pouvaient en modifier l'effet. Gros et Mandel (1952) ont étudié la diminution des acides nucléiques de la rate du Rat après une irradiation totale de 500 r. Ils observent, 12 heures après une telle irradiation, une chute de 45 0/0 de l'ARN et de 47 0/0 de l'ADN ; 4 jours après, la chute est de 50 0/0 pour l'ARN et de 75 0/0 pour l'ADN. La restauration commence le 6e jour et le 21e jour, le taux d'acides nucléiques a dépassé la normale. Uyeki, Leuchtenberger et Salerno (1959) observent aussi par microspectrophotométrie sur des noyaux colorés au Feulgen, une diminution de synthèse du DNA sur des noyaux de moelle fémorale de Lapin irradiée à 800 r.

De nombreux auteurs ont essayé de diminuer ces effets par le moyen de substances radioprotectrices connues. Il faut citer les travaux de Gros, Mandel et Rodesch (1953) qui ont montré que la cystéamine diminue de 25 à 75 0/0 la chute de l'ADN et de l'ARN chez le Rat entre le 4e et le 14e jour après une irradiation de 700 r. D'après Künkel et Schubert (1958) la cystéine protège la synthèse de l'ADN du Rat après une irradiation de 800 r. Mole et Temple (1957) ont montré que la cystéamine réduit de 25 0/0 la chute d'ADN de l'intestin grêle de Souris après une irradiation de 1.000 r. La méthionine est inefficace. La cystéamine protège aussi la synthèse de l'ADN de foie de Rat au repos et en régénération après une irradiation de 900 r (Hagen, 1958). D'après Goutier (1959) la cystamine n'empêche pas la chute initiale de l'ADN de la rate du Rat, mais l'arrête au 2e jour, après quoi il y a régénération à partir du 3e jour. Costachel, Furnica, Furnica et Popovici (1960) ont montré que l'AET protège contre la diminution des acides nucléiques du foie, du cerveau et de la rate, mais non du muscle, après une irradiation de 1.000 r. D'après Fisher, Anderson et Wilbon (1959), le froid et les radioprotecteurs sulfhydrylés (thiourée, hydroxyéthylthiuronium, mercaptoéthylguanidine, cystéamine) protègent des extraits de thymus de Rat contre la variation de leur viscosité après une irradiation de 10 r.

L'effet de l'oxygène a aussi été étudié du point de vue des acides nucléiques. Rambach, Alt et Cooper (1954) montrent que la synthèse du DNA est plus importante dans la moelle osseuse d'un animal hypoxique, 96 heures après une irradiation de 800 r. La chute de viscosité de l'ADN en solution après une irradiation de 7.000 r, se poursuit après la cessation de l'irradiation seulement en présence d'oxygène, le « post effect » est nul en absence d'$O_2$ (Daniels, Scholes et Weiss, 1955). Pour des cellules de tumeur ascitique de Souris, la diminution de synthèse de l'ADN est 2,9 fois plus forte en atmosphère d'$O^2$ pur qu'en atmosphère de $H_2$ pur (Berry, Hell, Lajtha, Ebert, 1960).

Pour compléter notre étude des radioprotecteurs chez l'embryon de Poulet, il nous a paru utile de rechercher, par un procédé histochimique, quel était le devenir des acides nucléiques des organes avec ou sans protection et de les comparer aux images normales. Cette étude sera l'objet des chapitres suivants.

## CHAPITRE PREMIER

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel utilisé est celui qui a servi aux expériences de radioprotection *in vivo* et *in vitro*, c'est-à-dire la partie céphalique de l'embryon de Poulet de 2 à 3 jours d'incubation d'une part, l'intestin de Poulet de 10 jours d'incubation cultivé *in vitro* d'autre part.

Les techniques utilisées pour la mise en évidence des acides nucléiques sont les techniques histochimiques classiques : la réaction nucléique de Feulgen pour les ADN d'une part, la coloration au vert de méthyle-pyronine pour les ARN d'autre part.

Le contrôle de la spécificité de la réaction de Feulgen se fait par réaction sur une préparation non hydrolysée, qui ne développe aucune coloration avec le réactif de Schiff.

Dans la pratique, la méthode suivie est celle-ci :

1° Les pièces sont fixées au Zenker et incluses dans la paraffine, puis coupées à une épaisseur de 5 μ.

2° Les coupes sont déparaffinées, collodionnées, lavées au lugol pour les débarrasser des précipités de sublimé et hydrolysées à l'étuve à 60° par l'acide chlorhydrique normal pendant 8 minutes.

3° Les coupes sont traitées au réactif de Schiff pendant 60 minutes et rincées à l'eau sulfureuse et à l'eau courante.

4° Les coupes sont déshydratées et montées au baume sans coloration de fond. On voit ainsi apparaître, au microscope, une coloration violette intense, sur fond clair, spécifique des ADN. Les témoins n'ayant pas été hydrolysés sont restés absolument incolores.

Brachet (1942) a montré que les acides ribonucléiques du cytoplasme pouvaient être colorés spécifiquement par la pyronine avec le colorant de Unna-Pappenheim au vert de méthyle-pyronine. Les ADN présentent en effet une affinité pour le vert de méthyle et les ARN une affinité pour la pyronine. Le contrôle de la spécificité de la réaction se fait par action préalable de la ribonucléase qui laisse seule subsister la coloration verte et supprime la coloration rouge de la pyronine.

Le mode opératoire est le suivant :

1° Les pièces sont fixées au Carnoy et incluses dans la paraffine, puis coupées à une épaisseur de 5 μ.

2° Les coupes sont déparaffinées, hydratées et traitées au colorant de Unna-Pappenheim pendant 15 à 30 minutes.

3° Les coupes sont rapidement déshydratées et montées au baume.

L'observation au microscope laisse apparaître des noyaux colorés en vert, alors que le cytoplasme et les nucléoles sont colorés en rouge.

## CHAPITRE II

## RÉSULTATS

### I. — Etude des ADN.

La coloration par la réaction de Feulgen permet de suivre de façon très nette et très spécifique l'évolution des acides désoxyribonucléiques dans le noyau des cellules irradiées. D'une façon générale, un organe irradié montre, quelque temps après l'irradiation, un certain nombre de pycnoses, d'autant plus nombreuses que la dose de rayonnement a été plus forte. Ces pycnoses sont caractéristiques de l'action des rayons X sur de nombreux tissus et sont responsables de la mort des cellules irradiées. Elles ont été étudiées en détail par Schrek (1947, 1948) et par Trowell (1952) sur les lymphocytes du Rat *in vivo* et *in vitro*. Trowell distingue cinq phases successives après irradiation : 1) La chromatine, réticulée dans le noyau normal au repos, se ramasse en paquets de dimension et de forme variables ; 2) La chromatine se répartit à la périphérie du noyau en laissant une grande vacuole centrale (vacuole de Schrek) ; 3) La pycnose proprement dite où la chromatine se condense en une sphérule dense et arrondie ; 4) La sphérule de chromatine se rétrécit tout en gardant sa forme arrondie ; 5) La chromatine se fragmente en un nombre variable de petites billes très denses (karyorrhexis). Ces différents stades ont été retrouvés sur les organes irradiés et ont permis de se faire une idée du degré de lésion des différents organes étudiés après irradiation, avec ou sans protection.

#### A. — Étude de la tête.

##### 1) *Embryons témoins irradiés.*

La tête entière de l'embryon, comprenant une partie irradiée (prosencéphale, bourgeon frontal et vésicules optiques) et une partie non irradiée (mésencéphale), a été fixée et colorée par la réaction de Feulgen. Cette étude a été faite systématiquement pour des temps différents après l'irradiation correspondant à : 10 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 h. 30 min., 2 h. 30 min., 3 heures, 6 heures, 9 heures, 12 heures, 15 heures, 18 heures, 21 heures et 24 heures. La dose de rayons X a toujours été la même, correspondant à celle utilisée le plus souvent dans les expériences de radioprotection ; il s'agit de la dose de 5.000 r donnant environ 95 0/0 de cyclocéphales anophtalmes.

En suivant l'apparition des pycnoses après une telle irradiation, on est amené à faire les constatations suivantes :

1° 10 minutes après l'irradiation, l'aspect de la coupe semble tout à fait normal, cependant quelques pycnoses apparaissent déjà, réparties en petits amas dans le mésenchyme.

2° 45 minutes après l'irradiation, on observe quelques rares amas pycnotiques isolés dans le mésenchyme et dans le tube nerveux, mais on note d'autre part une diminution très nette du nombre des mitoses.

En effet, la surface interne du tube neural qui compte normalement un nombre considérable de mitoses, n'en montre, à ce stade-là, presque plus. Si l'on compte le nombre de mitoses sur le bord interne du tube nerveux, au niveau des yeux, sur une centaine de coupes, on en trouve en moyenne 0,64 chez l'irradié et 31,82 chez le normal au même stade (fig. 36).

Fig. 36. — Portion de tube nerveux d'embryon normal à 48 heures d'incubation. Nombreuses mitoses sur le bord interne du tube (Feulgen) (× 320).

3° Une heure et demie après l'irradiation, le phénomène devient explosif et on compte environ la moitié des noyaux à l'état pycnotique, aussi bien dans le tube nerveux et les yeux que dans le mésenchyme céphalique et le tégument. Seuls les amas de cellules ganglionnaires semblent bien résister à l'irradiation. Il n'y a plus de mitose. En même emps les cellules pycnotiques du tube neural se desquament et viennent

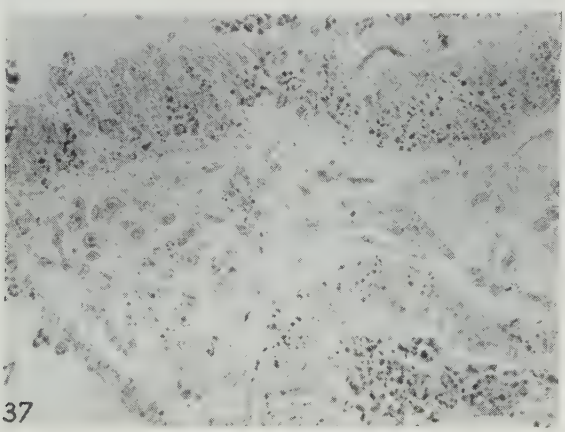



Fig. 37. — Portion de tube nerveux et de vésicule optique d'embryon fixé 90 minutes après une irradiation de 5.000 r. Nombreuses pycnoses (Feulgen) (× 320).

encombrer la lumière du tube de débris. Le moment d'apparition de cette phase pycnotique explosive peut varier dans une certaine mesure suivant l'individu considéré (fig. 37).

4° Ensuite, entre 2 heures et 12 heures après l'irradiation, l'aspect des coupes ne se modifie guère. Au fur et à mesure que les cellules pycnotiques se desquament et sont éliminées dans la lumière du tube nerveux, de nouvelles pycnoses apparaissent et il en résulte un amincissement de la paroi du tube neural et une diminution générale de volume, sans que la proportion de noyaux pycnotiques paraisse beaucoup varier (fig. 38).

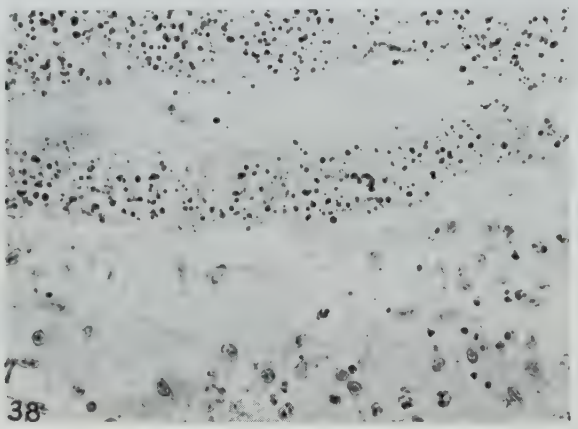



Fig. 38. — Tube nerveux d'embryon fixé 3 heures après une irradiation de 5.000 r. Nombreuses pycnoses, accumulation de débris cellulaires dans la lumière du tube (Feulgen) (× 320).

Fig. 39. — Tube nerveux d'embryon fixé 18 heures après une irradiation de 5.000 r. Paroi du tube très amincie, nombreuses pycnoses encombrant la lumière du tube (Feulgen) (× 320).

5° Entre 12 heures et 24 heures après l'irradiation, tous les noyaux deviennent progressivement pycnotiques. La paroi du tube nerveux s'amincit jusqu'à devenir unistratifiée, puis disparaît complètement, le mésenchyme est rempli de noyaux pycnotiques qu'on ne distingue plus de ceux qui étaient dans la lumière du tube neural. Seul le tégument conserve une structure, qui maintient encore une certaine fonction d'enveloppement. Il reste cependant çà et là quelques rares noyaux sains isolés (fig. 39, 40).

Dans les 24 heures qui suivent, tout ce matériel disparaît complètement, la cicatrisation est nette. Il ne reste de la tête que la partie non irradiée.

Il semblait tentant, devant ces résultats, de préciser les choses en dénombrant les noyaux pycnotiques par rapport aux noyaux sains et

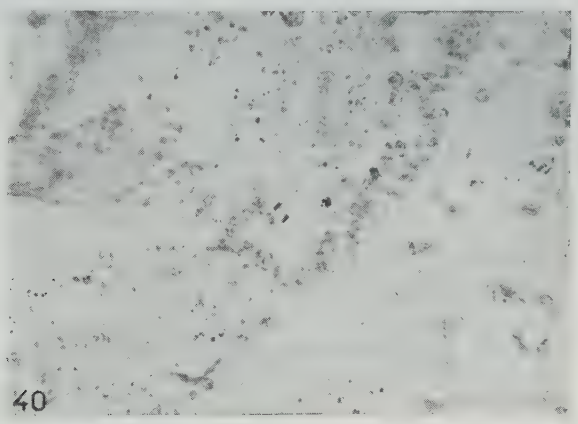



Fig. 40. — Tube nerveux d'embryon fixé 24 heures après une irradiation de 5.000 r. Tissu complètement désorganisé, quelques cellules sont en mitose (Feulgen) (× 320).

d'établir ainsi l'évolution dans le temps de l'index pycnotique. Ceci n'a malheureusement pas pu être réalisé pour deux raisons :

1° Les différents stades de la pycnose se retrouvent sur une même coupe, si bien que le phénomène de karyorrhexis empêche de savoir à combien de noyaux se rapporte le nombre d'amas de chromatine vus au microscope.

2° Au fur et à mesure que les noyaux poursuivent leur pycnose, les cellules se desquament et sont éliminées dans la lumière du tube neural, de sorte que même si l'on pouvait compter les noyaux pycnotiques à un moment donné, on ne saurait pas combien se sont échappés depuis le début de l'expérience.

Cependant, les coupes présentées sont, semble-t-il, assez claires et assez nettes pour qu'on puisse facilement les comparer d'emblée, avec les images des embryons normaux ou protégés.

En ce qui concerne les embryons normaux, ils poursuivent leur différenciation et leur croissance entre le 2e et le 3e jour de l'incubation, sans jamais présenter les phénomènes décrits ci-dessus. Seules quelques rares figures pycnotiques très isolées sont visibles de temps à autre.

On peut remarquer enfin que la répartition des pycnoses est sans rapport avec l'activité mitotique normale de l'embryon à ce stade, en effet :

1° Les mitoses dans le tube neural normal sont presque exclusivement réparties sur la surface interne du tube alors que les pycnoses affectent également toute son épaisseur.

2° Quelques heures après l'irradiation environ la moitié des cellules présentes sont devenues pycnotiques, alors que bien peu de cellules au total seraient normalement entrées en mitose pendant ce laps de temps.

3° Il arrive sporadiquement de trouver une cellule en mitose sur un embryon irradié, même 24 heures après l'irradiation (fig. 40). L'irradiation diminue fortement, mais ne supprime pas totalement le pouvoir mitotique.

### 2) *Embryons protégés.*

Les mêmes séries de coloration, échelonnées dans le temps ont été faites sur des têtes d'embryons protégés afin de savoir si les noyaux étaient d'emblée protégés contre l'action des rayons X, ou bien si, au contraire, on pouvait apercevoir des lésions précoces réparées par la suite.

Étant donné que le type de protection semble macroscopiquement le même, quel que soit l'agent protecteur utilisé, nous avons choisi deux méthodes donnant de bons résultats pour ces expériences. Les coupes ont été faites sur deux séries d'embryons, l'une protégée à la cystéamine, l'autre protégée par une atmosphère d'azote.

Dans les deux cas, les coupes faites à différents stades (fig. 41, 43) montrent clairement que, pourvu que l'on s'adresse à un embryon qui a été bien protégé, aucune des lésions observées chez les témoins ne se retrouve chez le protégé. Dans les meilleurs cas, on ne peut trouver aucune différence entre le normal et le protégé ; et ceci, quel que soit le moment choisi après l'irradiation. Non seulement il n'y a pas ou peu de pycnoses, mais encore le nombre de mitoses est sensiblement normal.

Si on compte le nombre de mitoses sur le bord interne du tube nerveux au niveau des yeux, sur une centaine de coupes, on en trouve, en moyenne 25,34 chez le protégé et 31,82 chez le normal, 45 minutes après l'irradiation.

Chez les embryons incomplètement protégés, on voit apparaître quelques pycnoses, en nombre nettement inférieur à celui des témoins irra-

diés, mais toutes les cellules ne meurent pas et il reste, après 24 heures, un tissu diminué, mais capable cependant, par les cellules restées saines, de poursuivre son développement. C'est ainsi que l'on obtient des

Fig. 41. — Tube nerveux d'embryon protégé par une incubation en atmosphère d'azote, fixé 3 heures après une irradiation de 5.000 r. Pas de pycnose, quelques mitoses (Feulgen) (× 320).

embryons qui, sans être normaux, ne présentent pas une malformation complète (fig. 42).

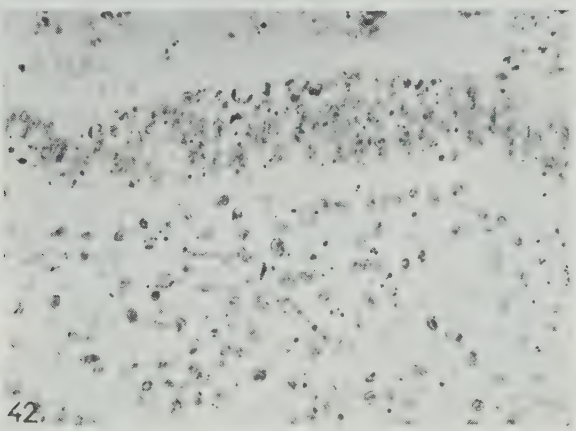



Fig. 42. — Tube nerveux d'embryon protégé par une incubation en atmosphère d'azote, fixé 24 heures après une irradiation de 5.000 r. Quelques pycnoses, structure conservée (Feulgen) (× 320).

Il y a donc bien eu protection vraie, au sens propre du terme, contre l'évolution vers la pycnose des cellules irradiées. A aucun moment on ne voit de réparation, un tissu bien protégé évoluera comme le normal,

un tissu moins bien protégé donnera des malformations plus ou moins accentuées. Chez le témoin non protégé, au contraire, toutes les cellules irradiées disparaissent en 48 heures.

Fig. 43. — Tube nerveux d'embryon protégé par une incubation en atmosphère d'azote, fixé 48 heures après une irradiation de 5.000 r. Structure normale, nombreuses mitoses (Feulgen) (× 320).

### B. — Étude de l'intestin de Poulet irradié *in vitro*.

Une série de colorations par la réaction de Feulgen a été entreprise sur des intestins de Poulet de 10 jours d'incubation, irradiés ou protégés, cultivés *in vitro*. Les coupes ont été faites sur des intestins protégés soit par le bleu de méthylène réduit, soit par l'anoxie, sur les témoins irradiés (4.800 r) et sur des témoins normaux (fig. 44).

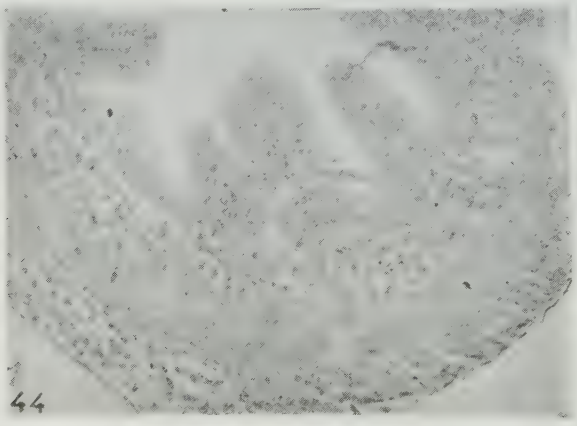



Fig. 44. — Intestin d'embryon normal de 10 jours d'incubation, fixé après 24 heures de culture (Feulgen) (× 320).

Les résultats sont, dans l'ensemble, tout à fait comparables à ceux obtenus ci-dessus pour la tête, cependant on constate les différences suivantes :

1° Le rythme d'apparition des pycnoses est plus lent que dans l'embryon. Les premières pycnoses apparaissent seulement 2 à 5 heures après l'irradiation. Il faut attendre 15 à 20 heures pour voir un nombre important de pycnoses. Ensuite, les cellules sont partiellement éliminées dans la lumière du tube intestinal et leur nombre diminue lentement, elles sont rares à 48 heures. Après 4 jours le mésenchyme est presque entièrement nécrosé, seul l'épithélium interne maintient sa structure (fig. 45, 47).

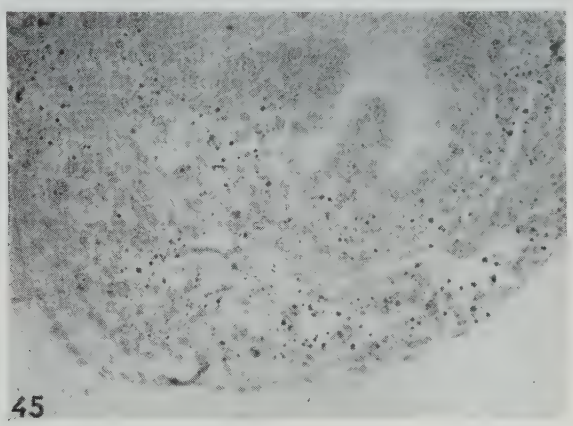



Fig. 45. — Intestin fixé après 24 heures de culture et 19 heures après une irradiation de 4.800 r. Nombreuses pycnoses dans les couches musculaires et mésenchymateuse (Feulgen) (× 320).

2° Les pycnoses sont très inégalement réparties suivant les tissus. Très abondantes dans les couches musculaires et mésenchymateuse, elles sont très rares dans l'épithélium interne. On assiste cependant à une diminution progressive de l'épaisseur de l'épithélium et à la disparition des villosités ; il reste en fin de culture, une couche unistratifiée disposée de façon circulaire sur une coupe transversale. Il est probable que les cellules pycnotiques sont éliminées très rapidement et que les cellules saines qui restent subissent un réarrangement.

3° Lorsqu'on observe un intestin protégé, soit à l'azote, soit au bleu de méthylène, on ne voit jamais une absence totale de pycnoses, mais :

*a*) les pycnoses sont moins nombreuses, et surtout elles apparaissent plus tardivement au sein du mésenchyme qui se nécrose plus lentement ;

*b*) l'épithélium interne perd moins de cellules, la lumière intestinale contient peu de débris et l'épithélium conserve une structure pluristratifiée et des villosités (fig. 46).

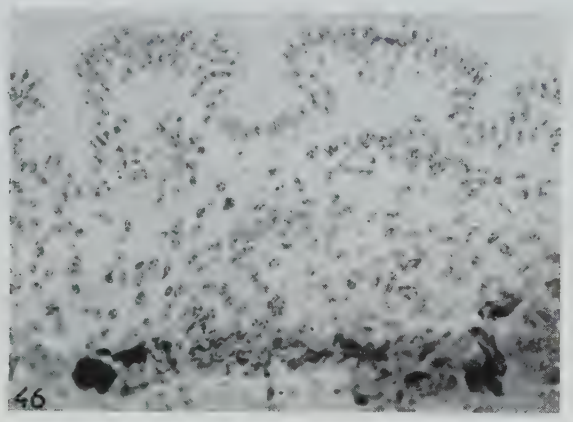



Fig. 46. — Intestin protégé par le bleu de méthylène, fixé après 9 jours de culture et 3 jours après une irradiation de 4.800 r. Pas de pycnose, épithélium pluristratifié et structuré en villosités (Feulgen) (× 320).

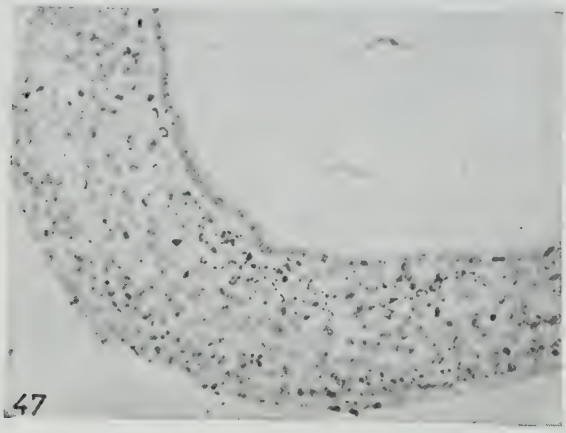



Fig. 47. — Intestin cultivé 9 jours et fixé 3 jours après une irradiation de 4.800 r. Nombreuses pycnoses, épithélium unistratifié, pas de villosité (Feulgen) (× 320).

## C. — Conclusion.

L'étude des noyaux des tissus irradiés, protégés ou non, conduit à faire les remarques suivantes :

1° Lorsqu'un tissu embryonnaire tel que la tête ou l'intestin de Poulet est irradié aux rayons X, tout se passe comme si l'on était en face d'un

processus biologique à l'échelon cellulaire. Les cellules lésées deviennent pycnotiques à plus ou moins brève échéance et selon une répartition qu semble vouée au hasard. Il ne paraît pas y avoir de rapport entre pycnose et mitose, car, d'une part le nombre de pycnoses à un moment donné est sans commune mesure avec le nombre de cellules qui seraient entrées en mitose à ce stade, et d'autre part, les pycnoses sont réparties dans tout le tissu, alors que les mitoses sont presque exclusivement limitées à la bordure interne du tube nerveux.

2° Lorsqu'un tissu a été protégé, soit par une substance radioprotectrice, soit par anoxie, tout se passe comme si le nombre des cellules atteintes par les rayons X était plus ou moins considérablement diminué, même totalement supprimé dans les meilleurs cas. On n'observe pas de réparation, les cellules sont protégées d'emblée contre les radiolésions.

C'est au moment de l'irradiation que la décision est prise, pour chaque cellule, en fonction de l'intensité du rayonnement et de l'efficacité du radioprotecteur, même si le phénomène visible, soit microscopiquement soit macroscopiquement, est différé dans le temps.

## II. — Étude des ARN.

La coloration au vert de méthyle-pyronine permet de suivre l'évolution des ADN et des ARN. La spécificité de la pyronine est établie par un traitement préalable à la ribonucléase qui supprime totalement la coloration rouge. Nous avons retrouvé ainsi les résultats exposés au paragraphe précédent sur les ADN, quoique de façon moins nette, la coloration verte étant moins vive et un peu masquée par le rouge intense de la pyronine.

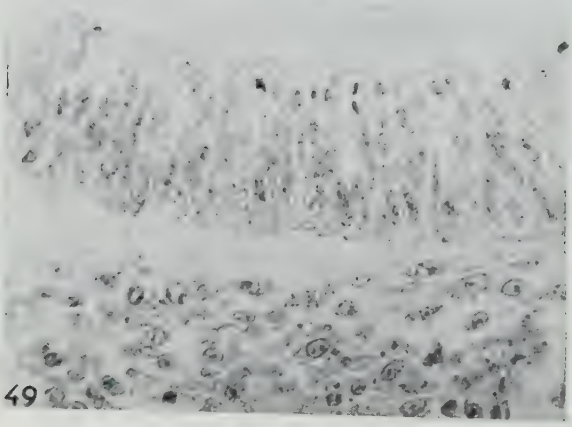
### A. — Étude de la partie céphalique de l'embryon de Poulet.

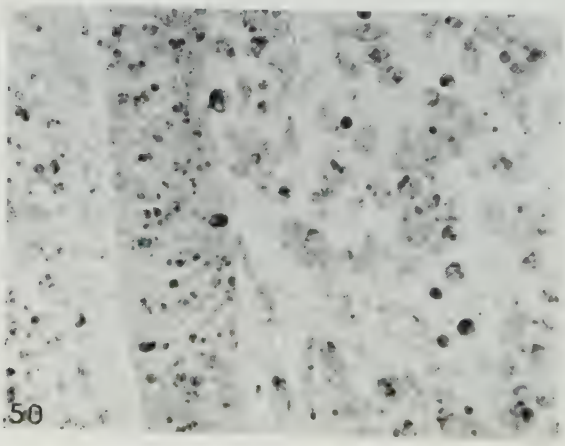
#### 1) *Embryons témoins irradiés.*

Le cytoplasme des cellules neurales normales montre une coloration à la pyronine assez dense, on observe en particulier des condensations de colorant à la surface du noyau (fig. 48). Ces condensations s'étirent parfois en pointe vers le bord extérieur du tube neural. Les cellules mésenchymateuses sont beaucoup moins chargées de ribonucléines et ne présentent qu'un ou deux capuchons de matériel coloré placés au contact du noyau.

Sur un embryon irradié, les altérations du cytoplasme apparaissent plus tard que celles du noyau. Deux heures après une irradiation de

48


49


50

5.000 r, il y a déjà de nombreuses pycnoses, mais le cytoplasme semble encore normal. Ce n'est que 5 heures, environ, après une telle irradiation que l'on voit apparaître des modifications très importantes (fig. 50). Les ribonucléines se présentent en effet sous la forme d'agglomérats d'un rouge intense, de dimensions variables et répartis un peu au hasard parmi les globules de chromatine pycnotique. On en trouve aussi parmi les débris venus se placer dans la lumière du tube nerveux. On les trouve aussi bien parmi les cellules du mésenchyme que parmi les cellules neurales. Il semble que le cytoplasme soit le siège d'un processus analogue à celui de la pycnose nucléaire, à cela près qu'il est légèrement différé dans le temps.

### 2) *Embryons protégés.*

Sur un embryon bien protégé, soit par l'anoxie, soit par la cystéamine, ces phénomènes ne s'observent pas. Il n'y a pas, ou peu de noyaux pycnotiques, il n'y a pas, ou peu, de dégénérescence cytoplasmique (fig. 49). Quel que soit le moment, après l'irradiation, où l'on fasse la coupe, le tissu semble parfaitement sain.

## B. — Étude de l'intestin de Poulet irradié *in vitro*.

Des phénomènes analogues à ceux décrits ci-dessus, se retrouvent sur les coupes d'intestins irradiés et protégés (fig. 51, 52). On remarquera seulement, comme nous l'avons vu lors de l'étude des ADN, que les altérations cellulaires apparaissent moins vite sur un organe en culture que sur l'embryon et que, d'autre part, le mésenchyme et les couches musculaires sont seuls à présenter les figures de dégénérescence en abondance, l'épithélium interne gardant très longtemps une apparence saine, tout en perdant petit à petit la plupart de ses cellules. Les intestins protégés présentent des altérations cellulaires analogues, sauf en ce qui concerne l'épithélium qui conserve une structure en villosités.

Fig. 48. — Portion de tube nerveux d'embryon normal à 48 heures d'incubation (Vert de méthyle-pyronine) (× 500).

Fig. 49. — Tube nerveux protégé par une incubation en atmosphère d'hydrogène et fixé 5 heures après une irradiation de 5.000 r. Aspect normal, pas de pycnose (Vert de méthyle-pyronine) (× 500).

Fig. 50. — Tube nerveux d'embryon fixé 5 heures après une irradiation de 5.000 r. Nombreuses condensations cytoplasmiques, lumière du tube encombrée de déchets cellulaires (Vert de méthyle-pyronine) (× 500).

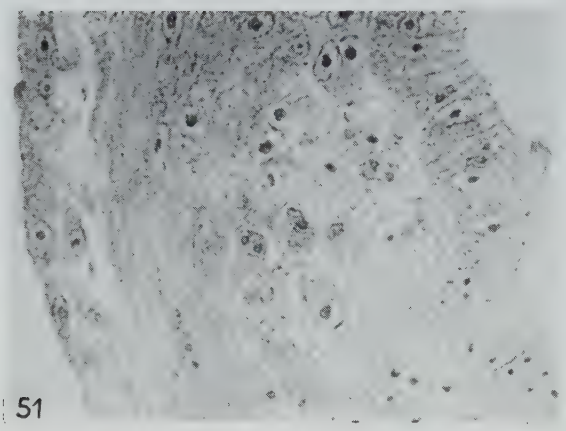



Fig. 51. — Intestin fixé après 9 jours de culture et 3 jours après une irradiation de 4.800 r. Pas de villosité (Vert de méthyle-pyronine) (× 500).

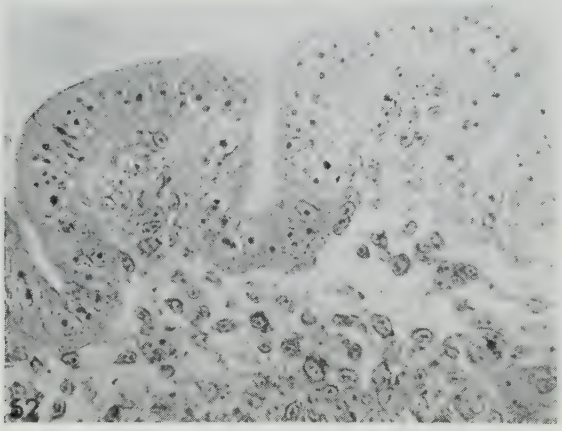



Fig. 52. — Intestin protégé par le bleu de méthylène, fixé après 9 jours de culture et 3 jours après une irradiation de 4.800 r. Epithélium structuré en villosités (Vert de méthyle-pyronine) (× 500).

## III. — Conclusions.

Il ressort de cette étude histochimique qualitative des acides nucléiques des différents organes de l'embryon de Poulet protégés contre une radiodestruction, soit par anoxie, soit par un agent chimique, que les lésions observées dans tous les cas chez les témoins, ne s'observent pas chez un embryon qui a été bien protégé. Elles s'observent dans une mesure moindre chez un embryon partiellement protégé. Tout se passe donc,

du point de vue qui nous intéresse ici, comme si l'effet de l'agent protecteur avait été de réduire, plus ou moins considérablement, la dose de rayons X appliquée, ou même de la supprimer complètement.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les irradiations localisées à des ébauches embryonnaires selon la technique de Ét. Wolff (1936) d'une part, l'explantation d'organes embryonnaires sur des milieux de culture selon la méthode de Ét. Wolff et K. Haffen d'autre part, permettent d'étudier d'une façon nouvelle l'influence de certains traitements radioprotecteurs ou radiosensibilisateurs.

En premier lieu, l'épreuve étant la survie et la différenciation d'une ébauche embryonnaire, il est possible de savoir si la substance agit directement contre l'effet des radiations ionisantes lorsqu'elle est présente dans la cellule au moment de l'irradiation ou par une réaction complexe ou secondaire de l'organisme lui-même, préalablement soumis au traitement radioprotecteur.

En second lieu, une irradiation localisée permet à l'organisme de survivre. L'épreuve n'est pas la vie ou la mort de l'animal. On pourra donc mettre en évidence des phénomènes de protection partielle ou faible puisque la survie de l'organisme n'est pas en cause.

En troisième lieu, la localisation de l'injection de substance radioprotectrice à l'organe à irradier, permet souvent d'injecter des doses plus élevées que lorsqu'on s'adresse à l'organisme entier.

Nous avons ainsi montré qu'il était possible de protéger une ébauche embryonnaire comprenant le prosencéphale, le bourgeon frontal et les vésicules optiques contre une irradiation tératogène qui détermine 95 0/0 des embryons traités à devenir cyclocéphales anophtalmes. Le tableau XLVII résume les résultats.

Ces expériences montrent qu'il existe des intermédiaires chimiques entre l'ionisation primaire et l'effet biologique et qu'il est possible d'en modifier l'action, par injection de certaines substances avant l'irradiation. L'influence radioprotectrice de corps tels que la cystéamine (MEA) ou le bleu de méthylène réduit, montre le rôle joué par les réducteurs dans la radioprotection. La diminution considérable de radiosensibilité déterminée par l'anoxie, montre l'importance essentielle de l'oxygène dans la sensibilité aux rayons X des organes embryonnaires. Cette remarque est confirmée par le fait que l'hyperoxie détermine une augmentation de la radiosensibilité. La faible influence radioprotectrice du diéthyldithiocarbamate de sodium montre que les ions métalliques jouent un certain rôle dans le mode d'action des rayons X.

La culture *in vitro* d'organes tels que l'intestin ou le testicule d'embryon de Poulet a montré qu'il était possible de protéger, au moins partielle-

ment, un organe embryonnaire en dehors de toute connexion avec l'organisme. On a observé cependant que la protection était moins importante dans ces conditions. Cela peut s'expliquer si l'on remarque que les organes explantés, qui ne sont pas irrigués, respirent moins *in vitro* que *in ovo*. Ils sont donc déjà moins radiosensibles du fait même de l'hypoxie relative déterminée par la culture, et il sera plus difficile de les protéger. Ceci confirme encore l'extrême importance de l'oxygène dans la radiosensibilité des organes embryonnaires de Poulet.

L'étude histochimique qualitative des acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques des différents organes qui ont été utilisés pour les expériences de radioprotection, a montré que l'irradiation détermine l'apparition rapide d'un grand nombre de cellules pycnotiques, dans lesquelles les acides nucléiques se trouvent condensés en granules denses. Sur les organes protégés, au contraire, on ne voit pas de cellules pycnotiques, ou très peu, quel que soit le temps considéré après l'irradiation. Les cellules semblent protégées d'emblée contre les radiolésions, en ce qui concerne les acides nucléiques.

L'intérêt de ces recherches est d'aider à comprendre le mécanisme intime d'action des radiations ionisantes sur la cellule vivante. Ces résultats sont difficiles à expliquer dans le cadre de la théorie de la cible. Différentes théories ont été forgées depuis pour tenir compte des décou-

TABLEAU XLVII

*Tableau récapitulatif.*

| Substance | | | | MEA | Bleu réduit par l'embryon | Bleu réduit par l'embryon | Bleu réduit par le jus d'embryon | DDC | DDC | 8-oxyquinoline |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentration | | | | M/30,8 | M/61,6 | M/308 | M/308 | M/4,5 | M/4,5 | M/72,5 |
| Dose de rayons X (r) | 3.000 | 4.000 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 3.000 | 4.000 |
| Cyclocéphalie (0/0) | 67 | 90 | 95 | 6 | 40 | 50 | 67 | 51 | 6 | 40 |
| Anophtalmie (0/0) | 75 | 90 | 98 | 26 | 80 | 50 | 82 | 85 | 24 | 67 |
| Gaz | Air | | Air | Air | $H_2$ | $N_2$ | $CO_2$ | $O_2$ | $O_2$ | |
| Dose de rayons X (r) | 2.800 | | 3.500 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 3.500 | 2.800 | |
| Cyclocéphalie (0/0) | 44 | | 52 | 92 | 7 | 21 | 29 | 86 | 72 | |
| Anophtalmie (0/0) | 80 | | 76 | 92 | 21 | 52 | 65 | 96 | 93 | |

vertes récentes. Elles font appel aux radicaux libres formés dans l'eau intracellulaire par les rayons X au moment de l'irradiation. Ces radicaux, oxydants pour la plupart, seraient neutralisés par la substance radioprotectrice très rapidement après leur formation, ce qui protégerait les molécules cellulaires radiosensibles contre une oxydation brutale (Bacq et Alexander, 1955).

Par ailleurs, les radicaux libres formés au cours de l'irradiation ne seraient pas les mêmes en présence et en absence d'oxygène. L'absence d'oxygène réduirait considérablement le nombre de radicaux oxydants et déterminerait ainsi une diminution de radiosensibilité (Gray, 1953).

Une troisième théorie se base sur la formation de liaisons disulfure entre les protéines sulfhydrylées et les radioprotecteurs. Les groupes — SH radiosensibles des protéines seraient ainsi masqués pendant l'irradiation (Eldjarn et Pihl, 1956). Cette hypothèse ne s'applique qu'aux radioprotecteurs sulfhydrylés.

Les phénomènes de radioprotection et de radiosensibilisation étudiés dans ce travail permettent de conclure que : 1) Il existe un effet chimique indirect des radiations ionisantes sur la matière vivante. Les réducteurs et l'anoxie jouent un rôle important dans le mécanisme de cet effet ; 2) Les rayons X agissent par un effet biologique direct sur la cellule irradiée.

## RÉSUMÉ

1. Un certain nombre de substances chimiques réputées radioprotectrices ont été éprouvées sur une malformation obtenue chez l'embryon de Poulet par une irradiation aux rayons X, suivant le procédé de Ét. Wolff : la cyclocéphalie. On obtient cette malformation à volonté au moyen d'une irradiation localisée de la partie prosencéphalique et des vésicules optiques d'un embryon de 48 heures d'incubation. Au 10e jour, l'embryon montre une absence complète du bec supérieur, du cerveau antérieur et des yeux. Le bec inférieur et la langue sont normaux, les orifices auditifs se sont rapprochés sur la ligne médiane et sont venus se mettre à la place occupée normalement par les yeux. L'anophtalmie s'ajoute en effet à la cyclocéphalie. Une irradiation de 5.000 r donne 95 0/0 de cyclocéphales anophtalmes dans les conditions qui ont été précisées dans le texte.

2. Les substances radioprotectrices éprouvées sont utilisées en solution aqueuse, à une concentration telle que la mortalité ne dépasse pas 50 0/0 des embryons traités. La solution est injectée localement, en quantité contrôlée, à l'aide d'une fine aiguille de verre montée sur le micro-injecteur d'Angel. Une irradiation semblable à celle décrite ci-dessus est pratiquée quelques heures après. La substance utilisée est dite radioprotectrice si le pourcentage de cyclocéphalie obtenu est significativement inférieur à celui des témoins.

3. La cystéamine, essayée dans ces conditions, s'est révélée très efficace puisque 6 0/0 seulement des embryons traités sont devenus cyclocéphales.

Le bleu de méthylène est inefficace dans ces conditions, mais s'il a été préalablement réduit en son leucodérivé, soit par l'embryon lui-même, soit par du jus d'embryon, soit par un organe en culture, on obtient respectivement 40 0/0, 67 0/0 et 67 0/0 de cyclocéphales.

Avec le diéthyldithiocarbamate de sodium, on obtient 51 0/0 de cyclocéphales.

La 8-oxyquinoline n'est protectrice que pour une dose de rayons X de 4.000 r au plus. On obtient dans ce cas 40 0/0 de cyclocéphales, alors qu'il y en a 90 0/0 chez les témoins.

4. Tous ces corps sont des radioprotecteurs vrais, en ce sens qu'ils ne sont efficaces que s'ils sont injectés avant l'irradiation. Injectés immédiatement après, ou injectés ailleurs que sur la tête, ils n'ont aucun effet. Ceci tend à montrer qu'ils agissent au niveau cellulaire en prévenant les radiolésions et non pas par une réaction générale et complexe de l'organisme.

5. Le cyanure de potassium, l'acide ascorbique et l'hyposulfite de sodium n'ont donné aucun résultat positif, soit parce qu'ils sont inefficaces du point de vue qui nous intéresse, soit parce qu'ils sont trop toxiques pour révéler cet effet.

6. Si l'œuf entier est placé, avant et pendant l'irradiation, dans une atmosphère dépourvue d'oxygène, il présente une haute résistance à l'irradiation. Nous avons essayé successivement des atmosphères d'hydrogène, d'azote et d'anhydride carbonique, qui nous ont donné respectivement 7 0/0, 21 0/0 et 29 0/0 de cyclocéphales. Il s'agit, ici encore, d'une radioprotection vraie puisque l'anoxie après l'irradiation est inefficace.

7. Inversement, si les œufs sont placés avant et pendant l'irradiation, dans une atmosphère d'oxygène pur, ils sont sensibilisés à l'action tératogène des rayons X. En effet, une dose de 3.500 r qui donne 52 0/0 de cyclocéphales dans l'air, en donne 86 0/0 dans l'oxygène.

On peut en conclure que les radiolésions cellulaires sont d'autant plus importantes que la quantité d'oxygène présente pendant l'irradiation est plus grande.

8. Ce même type d'expériences a été repris, non plus sur une malformation radio-induite, mais sur un organe d'embryon de Poulet cultivé *in vitro* selon la méthode de Wolff et Haffen. Notre choix s'est porté sur les intestins et les testicules d'embryons de 10 jours d'incubation. Ces organes présentent après irradiation certaines réactions caractéristiques, allant jusqu'à la nécrose ou la cytolyse.

9. C'est ainsi que se sont montrés d'une certaine efficacité, la cystéamine, le bleu de méthylène réduit et l'anoxie à l'hydrogène ou à l'azote, sur un intestin cultivé. Le testicule, par contre, n'a pu être protégé que par la cystéamine et contre une dose faible de rayonnement.

10. L'observation microscopique des organes irradiés a montré que l'épithélium interne de l'intestin est le tissu le mieux protégé, cependant

que les parties mésenchymateuses et musculaires présentent des lésions plus importantes. Les testicules protégés conservent une structure en cordons et quelques gonocytes.

11. Une série de colorations histochimiques par la réaction de Feulgen d'une part, au vert de méthyle-pyronine d'autre part, nous a permis de suivre l'évolution des acides nucléiques après irradiation chez les témoins et chez les protégés. C'est ainsi que l'on voit apparaître les premières pycnoses dans la partie céphalique d'un embryon irradié, très rapidement après l'irradiation, puis le nombre des pycnoses augmente jusqu'à devenir très important (environ la moitié des noyaux 2 heures après). Le tissu est complètement nécrosé au bout de 24 heures. Le phénomène est analogue, quoique un peu décalé dans le temps, en ce qui concerne les ribonucléines. Sur un embryon bien protégé, ces phénomènes n'apparaissent pas. On observe au contraire un aspect normal quel que soit le stade choisi. Tout se passe comme si le tissu avait été peu ou pas irradié.

12. Une étude analogue a été faite sur des intestins irradiés en culture et a donné des résultats analogues à ceci près que les pycnoses apparaissent plus lentement, il faut attendre 5 heures environ pour en voir un nombre important et plusieurs jours pour assister à la dégénérescence complète du tissu. D'autre part l'épithélium interne est toujours beaucoup moins pycnotique que les parties mésenchymateuses et musculaires. Les intestins protégés ne sont jamais totalement exempts de pycnoses, mais en présentent moins que les témoins et avec un certain retard.

*Laboratoire d'Embryologie expérimentale*
*du Collège de France et du C. N. R. S.*

Directeur : Professeur Étienne Wolff.

## BIBLIOGRAPHIE

Alexander (P.), Bacq (Z. M.), Cousens (S. F.), Fox (M.), Herve (A.) et Lazar (J. A.). — 1955. — Mode of action of some substances which protect against the lethal effects of X rays. *Rad. Res.*, **2**, n° 4, 392-415.

Alper (T.). — 1960. — Cellular radiobiology. *Ann. Rev. nucl. Sci.*, n° 10, 489-530.

Ancel (P.) et Houget (J.). — 1954. — Présentation d'un appareil destiné à faire à de jeunes embryons d'Oiseaux de petites injections localisées de substances chimiques. *J. Embryol. exp. Morph.*, **2**, **4**, 290-292.

Anderson (R. S.) et Turkovitz (A.). — 1941. — The experimental modification of the sensitivity of yeast to rœntgen rays. *Am. J. Rœntgenol. Radiumtherapy*, **46**, 537.

Babin (R.), Coustou (F.) et Delmon (G.). — 1955. — Action des rayons X sur des solutions d'acide ascorbique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **94**, n° sp., 69-71.

Baclesse (Fr.) et Loiseleur (J.). — 1947. — Modification de la radiosensibilité cutanée du Lapin au cours de l'hyperglycémie expérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, **141**, n$^{os}$ 13-14, 743-745.

— Sur la diminution de la radiosensibilité cutanée du Lapin hyperglycémié. *C. R. Soc. Biol.*, **141**, n$^{os}$ 23-24, 1160-1161.

Bacq (Z. M.). — 1956. — Efficacité et absence de toxicité de la cystéamine en ingestion chez le Rat. *Bull. Acad. Roy. Méd. Belg.*, 6$^{e}$ série, **21**, n° 4, 119-131.

— 1959. — Protection chimique contre les radiations ionisantes. *Radiobiologica latina*, II, **3**, 191-206.

Bacq (Z. M.) et Alexander (P.). — 1955. — *Principes de radiobiologie*. Masson, Paris, 478 pages.

Bacq (Z. M.), Ciccarone (P.) et Renson (J.). — 1959. — A system in the Mammalian skin sensitive to X-irradiation and insensitive to the oxygen effect. *Experientia*, **15**, fasc. 5, 175-176.

Bacq (Z. M.), Cuypers (Y.), Evrard (E.) et Sœtens (R.). — 1955. — Action de la cystéamine sur la résistance du Rat à la dépression barométrique. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 2014-2017.

Bacq (Z. M.) et Herve (A.). — 1951. — Effet protecteur du NaCN sur les racines de Pois soumises à l'action du rayonnement X. *Arch. intern. Physiol.*, **59**, n° 3, 348-356.

Bacq (Z. M.), Herve (A.), Lecomte (J.), Fischer (P.), Blavier (J.), Deschamps (G.), Le Bihan (H.) et Rayet (P.). — 1951. — Protection contre le rayonnement X par la β-mercaptoéthylamine. *Arch. intern. Physiol.*, **59**, n° 4, 442-447.

Bacq (Z. M.) et Herve (A.). — 1953. — Action protectrice des bloqueurs de cuivre (agents de chélation). *Arch. intern. Physiol.*, **61**, n° 3, 433-434.

Baldwin (W. K.) et Sgourakas (E.). — 1950. — The effect of oxygen concentration on the rate of X-ray-induced mutations in Drosophila. *Proc. Acad. Sci.*, **36**, 176-184.

Baldwin (W. F.) et Salthouse (T. M.). — 1959. — Oxygen deficiency and Radiation damage in the insect Rhodnius. *Nature*, **183**, n° 4666, 974.

Beaumariage (M. L.). — 1959. — Essai de prévention et traitement du mal des rayons chez le Poussin. *Internat. J. appl. Radioisotopes* (G. B.), **4**, n$^{os}$ 1-2, 69-93.

Bergonié (J.) et Tribondeau (L.). — 1906. — Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation rationnelle. *C. R. Acad. Sci.*, **143**, 983-985.

Berry (R. J.), Hell (E.), Lajtha (L. G.) et Ebert (M.). — 1960. — Mechanism of the radiation effect on the Synthesis of Deoxyribonucleic acid. *Nature*, **186**, n° 4724, 563-564.

Betz (H.). — 1950. — Sur le mécanisme d'action protectrice du cyanure de potassium sur la létalité des Souris irradiées. *C. R. Soc. Biol.*, **144**, n$^{os}$ 7-8, 593.

Betz (H.) et Herve (A.). — 1950. — L'effet protecteur de KCN sur la létalité de Souris irradiées à diverses doses de rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, **144**, 1015.

Brown (W. L.) et White (R. K.). — 1958. — Preirradiation fatigue as a factor in the prevention of irradiation deaths in rats. *J. genet. Psychol.* (U. S. A.), **93**, n° 2, 287-290.

Cavallini (D.), Mondovi (B.), Giovanella (B.) et De Marco (C.). — 1960. — Disulfide interchange by ionizing Radiation. *Science*, **131**, n° 3411, 1441.

Conger (A. D.). — 1956. — The effect of oxygen on the radiosensitivity of Mammalian cells. *Radiology*, **66** (1), 63-69.

Corradi (C.), Paoletti (F.) et Pozza (E.). — 1958. — Attività di alcune sostanze chelanti sulla sopravivvenza di Topi irradiati. *Atti Soc. lombarda Sci. med. biol.*, **13**, n° 1, 80-82.

Costachel (O.), Furnica (M.), Furnica (G.) et Popovici (D.). — 1960. — Variatiile acizilor nucleici, in tesuturi iradiate sub protectie en AET si sub protectie asociata (AET + Largactil). *Stud. Cerc. Biochim. Romin.*, **3**, n° 1, 21-31.

Crouch (B. G.) et Overmann (R. R.). — 1957. — Chemical protection against X-radiation death in primates. A preliminary report. *Science* (U. S. A.), **125**, n° 3257, 1092.

Crowther (J. A.). — 1924. — *Proc. roy. Soc.*, B, **96**, 207.

— 1926. — *Proc. roy. Soc.*, B, **100**, 390.

Dale (W. M.), Meredith (W. J.) et Tweedie (M. C. K.). — 1943. — *Nature*, **151**, 280.

Dale (W. M.). — 1940. — The effect of X-rays on enzymes. *Biochem. J.*, **34**, 1367.

— 1942. — The effect of X-rays on the conjugated protein *d*-amino-acid oxidase. *Biochem. J.*, **36**, 80-85.

— 1943. — Effect of X-rays on aqueous solutions of biologically active compounds. *Brit. J. Radiol.*, suppl. 1, 46-50.

— 1947. — *Brit. J. Radiol.*, suppl. 1, 46-50.

— 1948. — *Biochem. Journ.*, **36**, 80.

— 1952. — Protection effect and its specificity in irradiated aqueous solutions. *Disc. of the Faraday Soc.*, n° 12, 293-299.

Daniels (M.), Scholes (G.) et Weiss (J.). — 1955. — Studies on the action of X-rays on aqueous solutions of nucleic acids and some nucleotides. *Experientia*, **11**, 219-221.

Darcis (L.), Hotterbeex (P.) et Onkelinx (C.). — 1956. — Action du becaptan (β-mercapto-éthylamine) sur la radiosensibilité des cellules vaginales du Rat femelle. *Experientia* (Suisse), **12**, nº 8, 286-289.

Dé (P.), Bose (A.) et Bose (S.). — 1960. — Radioprotective efficacy of sodium cyanide. *Acta radiol.* (Suède), **53**, nº 2, 146-151.

Desaive (P.). — 1954. — Influences du mode d'irradiation, de l'hypophysectomie, des hormones gonadotropes et des radioprotecteurs chimiques sur la réponse de l'ovaire de Lapine aux rayons rœntgen. *Acta radiol.*, **41** (6), 545-557.

Desaive (P.), Bacq (Z. M.) et Herve (A.). — 1953. — Du comportement des testicules chez des Souris irradiées et protégées par un sel de becaptan. *J. belg. Radiol.*, **36**, nº 4, 504-525.

Devik (F.). — 1952. — Cytological investigation of bone marrow of Mice after administration of protective agents and subsequent X-irradiation. *Brit. J. Radiol.*, **25**, 481.

Dewey (D. L.). — 1960. — Effect of oxygen and nitric oxide on the radiosensitivity of human cells in tissue culture. *Nature*, **186** (4727), 780-782.

Doherty (D. G.) et Burnett (W. T.). — 1955. — Protective effect of S, β-aminoethylisothiuronium Br — HBr and related compounds against X-radiations death in Mice. *Proc. Soc. biol. Med.* (U. S. A.), **89**, nº 2, 312-314.

Doherty (D. G.), Burnett (W. T.) et Shapira (R.). — 1957. — Chemical protection against ionizing radiation. II. Mercaptoalkylamines and related compounds with protective activity. *Rad. Res.*, **7** (1), 13-21.

Dowdy (A. H.), Bennett (L. R.) et Chastain (S. H.). — 1950. — Protective action of anoxic anoxia against total body rœntgen irradiation of Mammals. *Radiology* **55**, 879-885.

Drasil (Y.) et Drasilova (L.). — 1956. — *Scripta med.* (Brno), **29** (3/4), 93-100.

Ebert (M.) et Howard (A.). — 1958. — Modification of X-ray sensitivity of Bean roots by hydrogen gas. *Nature* (G. B.), **176**, nº 4487, 828-829.

— 1958. — *Modification of the oxygen effect by gases. Les peroxydes organiques en radiobiologie.* Masson, 1958, 113-116.

Eldjarn (L.) et Pihl (A.). — 1956. — On the mode of X-ray protective agents. I. The fixation *in vivo* of cystamine and cysteamine to proteins. *J. biol. Chem.*, **223**, nº 1, 341-352.

— 1960. — Mechanisms of protective and sensitiviting action. *Mechanisms in Radiobiology*, 231-296.

Ellis (F.). — 1942. — Volume dosage in deep X-ray Therapy. *Brit. J. Radiol.*, **15**, 194-201.

Evans (T. C.), Goodrich (J. P.) et Slaughter (J. C.). — 1941. — *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **46**, 662 et **47**, 434.

Fisher (W. D.), Anderson (N. G.) et Willbon (K. M.). — 1959. — Studies on nuclei. II. Effect of X-rays on deoxyribonucleoprotein from Rat thymus. *Exper. Cell Res.*, **18**, nº 3, 481-493.

Fricke (H.). — 1934. — The Reduction of Oxygen to Hydrogen peroxide by Irradiation of its aqueous solution with X-rays. *J. Chem. Phys.*, **2**, 556-557.

Fricke (H.), Hart (E. J.) et Smith (H. P.). — 1938. — Chemical reactions of organic compounds with X-ray-activated water. *J. Chem. Phys.*, **6**, 229-240.

Gaulden (M. E.) et Nix (M.). — 1950. — Effects of oxygen tension on X-ray induced mitotic inhibition. *Genetics*, **35**, 665.

Giles (N. H.) et Riley (H. P.). — 1950. — Studies on the mechanism of the oxygen effect on the radiosensitivity of Tradescantia chromosomes *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **36**, 337-44.

Goffinet (J.). — 1956. — L'influence de certaines substances sur l'action tératogène des rayons X. *Arch. Anat. micr. Morph. exper.*, **45**, 162-172.

Goutier (R.). — 1959. — La désoxyribonucléase acide de la rate après irradiation chez des Rats normaux et des Rats protégés par la cystamine. *Arch. intern. Physiol. Biochem.*, **67** (1), 15-23.

Gray (L. H.). — 1953. — The initiation and development of cellular damage by ionizing radiation. *Brit. J. Radiol.*, **26**, 609.

— 1956. — *Progress in Radiobiology*, **267** (Oliver and Boyd, Edinburgh).

— 1957. — Oxygenation in radiotherapy. I. Radiobiological considerations. *Brit. J. Radiol.*, **30**, 403-406.

Gros (C. M.) et Mandel (P.). — 1952. — Action d'irradiation totale du Rat sur les acides nucléiques de la rate. *J. belge de Radiol.*, **35**, 357-359.

Gros (C. M.), Mandel (P.) et Rodesch (J.). — 1953. — Action de la β-mercaptoéthylamine sur l'évolution des acides nucléiques de la Rate après irradiation totale par les rayons X. *C. R. Acad. Sci.*, **236**, 2010-2012.

Hagen (U.). — 1958. — Radiosensitivity of desoxyribonucleic acid synthesis in regenerating liver (modification by protective substances). *Rad. Res.*, **9**, n° 1, 125-126.

Hagen (U.) et Koch (R.). — 1956. — *Progress in Radiobiology*, **257** (Oliver and Boyd, Edinburgh).

Haggqvist (A.) et Hevesy (G.). — 1958. — The combined effect of heavy water and rœntgen irradiation on the animal organism. *Acta radiol.*, **49** (4), 321-335.

Held (E. E.) et Bellamy (A. W.). — 1950. — *Nucl. Sci. Abstr.*, **4**, 3843.

Herve (A.) et Bacq (Z. M.). — 1949. — Cyanure et dose létale de rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 881-883.

— 1949. — Sulfocyanure, tocophérol et rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, n$^{os}$ 15-16, 1158-1159.

Hollaender (A.) et Doudney (C. O.). — 1954. — Studies on the mechanism of radiation protection and recovery with cysteamine and β-mercaptoethanol. *Symposium de Radiobiologie*, Liège, 112-115.

Hollaender (A.), Stapleton (G.E.) et Martin (F. L.). — 1951. — X-ray sensitivity of *E. coli* as modified by oxygen tension. *Nature*, **167**, 103.

Holthusen (N.). — 1921. — *Arch. ges. Physiol.*, **187**, 51.

Howard-Flanders (P.). — 1957. — Effect of nitric oxide on the radiosensitivity of Bacteria. *Nature*, **180**, n° 4596, 1191-1192.

Howard-Flanders (P.) et Alper (T.). — 1957. — The sensitivity of microorganisms to irradiation under controlled gas conditions. *Rad. Res.*, **7**, 518-540.

Howard-Flanders (P.) et Wright (E. A.). — 1957. — The effect of oxygen on the radiosensitivity of growing bone in the tail of the Mouse. *Brit. J. Radiol.*, **30**, 359, 593-599.

Ingalls (T. H.). — 1950. — Anoxia as a cause of fetal death and congenital defect in the Mouse. *Amer. J. Dis. Child.*, **80**, 34-45.

Jolly (J.). — 1924. — Mode d'action des rayons X sur les cellules. Irradiation d'organes isolés. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 79.

Jones (M. M.). — 1960. — An alternative mechanism for chemical protection against radiation damage. *Nature* (G. B.), **185**, n° 4706, 96-97.

Kaplan (W. D.) et Lyon (M. F.). — 1953. — Failure of mercaptoethylamine to protect against the mutagenic effects of radiation. I. Experiments with Drosophila. II. Experiments with Mice. *Science* (U. S. A.), **118**, n° 3078, 776-778.

Kimball (R. F.) et Gaither (N.). — 1952. — *Nucl. Sci. Abstr.*, **6**, 48.

Kirrmann (J. M.). — 1955. — L'influence protectrice de la cystéamine contre l'action tératogène des rayons X. *Bull. Biol.*, **89**, n° 4, 491-509.

— 1957. — Sur le pouvoir radioprotecteur du bleu de méthylène. *C. R. Acad. Sci.*, **244**, 2660-2661.

— 1957. — Sur le pouvoir radioprotecteur de l'hydrogène gazeux. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, n° 25, 2413-2414.

— 1959. — Sur la protection exercée par certains gaz et la sensibilisation exercée par l'oxygène sur la radiosensibilité des ébauches embryonnaires. *C. R. Acad. Sci.*, **249**, 458-459.

— 1962. — Étude de quelques phénomènes de radioprotection sur un organe embryonnaire de Poulet cultivé *in vitro*. *J. embr. exp. morph.*, **10**, 27-37.

Kohn (H. I.) et Gunter (S. E.). — 1960. — Cysteine protection against X-rays and the factor of oxygen tension. *Rad. Res.*, **13** (2), 250-255.

Künkel (H. A.) et Schubert (G.). — 1958. — The influence of total-body irradiation on deoxyribonucleic acid synthesis and the protective action of cysteine. Investigations on Rats and hibernating Loirs. *Rad. Res.*, **9**, n° 1, 141.

Lacassagne (A.). — 1942. — Chute de la sensibilité aux rayons X chez la Souris nouveau-née en état d'asphyxie. *C. R. Acad. Sci.*, **215**, 231-232.

Lacassagne (A.), Duplan (J. F.) et Buu-Hoi (N. P.). — 1954. — Préservation contre les effets létaux des rayons X par les 4-acylpyrogallols, chez la Souris. *C. R. Acad. Sci.*, **238**, n° 12, 1279-1281.

LANGENDORFF (H.), KOCH (R.) et HAGEN (U.). — 1954. — Mécanisme de l'action de la thiourée dans la protection biologique contre l'irradiation. *Arch. intern. Pharmacodyn. Thérap. belg.*, **100**, n° 1, 1-16.

LANGHOF (H.) et SCHWENKE (W.).— 1956.— Ueber den Einfluss eine herabgesetzten Blutzirkulation auf die Rö.-Strahlentoleranz der Gewebe. *Hautarzt*, **7**, n° 6, 272-273.

LATARJET (R.). — 1952. — Some factors influencing cell radiosensitivity by acting at the level of the primary biochemical action. *Symposium on Radiobiology*, edited by J. J. Nickson, New York, Wiley, 241-258.

LATARJET (R.) et EPHRATI (E.). — 1948. — Influence protectrice de certaines substances contre l'inactivation d'un bactériophage par les rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, **142**, n$^{os}$ 7-8, 497-499.

LATARJET (R.) et GRAY (L. H.). — 1954. — Definition of the terms « protection » and « restoration ». *Acta radiol.* (Suède), **41**, n° 1, 61-62.

LATARJET (R.), LARTIGUE (O.) et ESTIENNE (E.). — 1961. — Protection chimique élective de l'intestin chez des Souris irradiées à doses supralétales de rayons X. *C. R. Acad. Sci.*, **252**, n° 6, 948-950.

LATARJET (R.) et LOISELEUR (J.). — 1942. — Modalités de la fixation de l'oxygène en radiobiologie. *C. R. Soc. Biol.*, **136**, 60-62.

LÉA (D. E.). — 1946. — *Actions of radiations on living cells*. Cambridge University Press.

LELIÈVRE (P.) et BETZ (E. H.). — 1961. — Influence du versène sur la consommation d'oxygène des tissus *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, **155**, n° 1, 199-201.

LIMPEROS (G.). — 1951. — *Nucl. Sci. Abstr.*, **5**, 2337.

LOISELEUR (J.) et PETIT (M.). — 1959. — Résistance du Rat, en auto-anoxie, contre l'administration d'une dose mortelle de rayons X. *C. R. Acad. Sci.*, **249**, n° 2, 323-325.

LÜNING (K. G.), FROLEN (H.) et NELSON (A.). — 1961. — The protective effect of cysteamine against genetic damages by X-rays in spermatozoa from Mice. *Rad. Res.*, **14**, n° 6, 813-818.

MAISIN (J. R.) et DOHERTY (D. G.). — 1960. — Chemical protection of Mammalian tissues. *Feder. Proc.* (U. S. A.), **19**, n° 2, 564-572.

MAISIN (H.), DUNJIC (A.), MALDAGUE (P.) et MAISIN (J.). — 1955. — Au sujet de la protection des embryons irradiés *in utero* par la mercaptoéthylamine. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1687-1690.

MIKAELSEN (K.). — 1954. — Cytological effect of chronic gamma irradiation and the protective property of certain chemicals against the radiation induced chromosome aberrations. *Symposium de Radiobiologie*, Liège, 316-320.

MITCHELL (J. S.). — 1949. — Histological Changes produced by large doses of tetra-sodium 2-methyl-1 : 4-naphtohydroquinone diphosphate in some human tumours. *Experientia*, **5**, 293-295.

MOLE (R. H.) et TEMPLE (D. M.). — 1957. — Intestinal damage by radiation and its chemical modification. *Nature* (G. B.), **180**, n° 4597, 1278.

MOTTRAM (J. C.). — 1935. — On the alteration in sensitivity of cell towards radiation produced by cold and anaerobiosis. *Brit. J. Radiol.*, **8**, 32-39.

NEUKOMM (S.), PEGUIRON (L.) et HERVE (A.). — 1954. — Action de la cystéamine sur les tumeurs greffées, irradiées *in loco*. *Symposium de Radiobiologie*, Liège, 298-303.

NIZET (A.), BACQ (Z. M.) et HERVE (A.). — 1952. — Blocage de la maturation des hématies jeunes par les rayons X. Effet protecteur du pyruvate et de la β-mercaptoéthylamine. *Arch. intern. Physiol.*, **60**, 449-458.

OFTEDAL (P.), OFTEBRO (R.) et EKER (R.). — 1958. — Radioprotective properties of cystamine, cysteamine and cysteine when tested with Chick fibroblasts *in vitro*. *Nature* (G. B.), **181**, n° 4605, 344-345.

OSBORNE (T. B.) et HEYL (F. W.). — The pyrimidine derivatives of nucleic acid. *Amer. J. Physiol.*, **21**, 157-161.

PATT (H. M.), SMITH (D. E.), TYREE (E. B.) et STRAUBE (R. L.). — 1950. — Further studies on modification of sensitivity to X-rays by cysteine. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **73**, 18-21.

PATT (H. M.), TYREE (E. B.), STRAUBE (R. L.) et SMITH (D. E.). — 1949. — Cysteine protection against X-irradiation. *Science*, **110**, 213-214.

PATT (M. H.). — 1960. — Chemical approaches to radiation protection in Mammals. *Feder. Proc.*, **19**, n° 2, 549-553.

Peters (T.). — 1955. — Die Entwicklung ungefurchter Molchkeime nach Behandlung mit Röntgenstrahlen im Kombination mit Sauerstoffmangel, Kälte, und Blausäure. *Strahlentherapie*, **98**, 628-639.

Petry (E.). — 1923. — Zur Kenntnis der Bedingungen der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen. *Bioch. Z.*, **135**, 353-383.

Quastler (H.). — 1956. — The nature of intestinal radiation death. *Rad. Res.*, **4**, 303-320.

Radivojevitch (D.), Bacq (Z. M.) et Beaumariage (M.-L.). — 1960. — Action radioprotectrice de la cystamine et de l'histamine sur l'épilation du Souriceau exposé au rayonnement X. *J. Physiol.*, **52**, nº 1, 205-206.

Rambach (W. A.), Alt (H. L.) et Cooper (J. A. D.). — 1954. — Protective effect of hypoxia against irradiation injury of the Rat bone marrow and spleen. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **86**, 159-161.

Risse (O.). — 1929. — Einige Bemerkungen zum Mechanismus chemischer Röntgenreaktionen in wassrigen Lösungen. *Strahlentherapie*, **34**, 578-582.

— 1930. — Die physikalischen Grundlagen der chemischen Wirkungen des Lichts und der Röntgenstrahlen. *Ergebn. Physiol.*, **30**, 243-293.

Robinson (J. E.) et Revesz (L.). — 1961. — Sensitivity of mammalian cells *in vitro* to X-irradiation in Air and in Absence of Oxygen. *Rad. Res.*, **14**, nº 4, 493.

Rugh (R.). — 1954. — The effect of ionizing radiations on Amphibian development. *J. cell. comp. Physiol.*, **43** (suppl. 1), 39-76.

Rugh (R.) et Clugston (H.). — 1956. — Protection of Mouse fetus against X-irradiation death. *Science* (U. S. A.), **123**, nº 3184, 28-29.

Russel (W. L.). — 1951. — *Cold Spring Harb. Symp.*, XVI, 327.

Sanides (F.). — 1956. — Die letale und teratogene Wirkung von Röntgenstrahlen auf ungefurchte Keime und Gastrulen von *Triton alpestris* in verschiedenartigen Milieu. *Biol. Zlbl.*, **75** (3/4), 149-177.

Schleich (A.). — 1961. — Studies on radioprotection of various compounds *in vitro* and *in vivo*. *Annals of New York Acad. Sci.*, **95**, 2, 1009-1020.

Schrek (R.). — 1947. — Primary and secondary vacuoles in thymic cells exposed *in vitro* to X-rays. *J. cell. comp. Physiol.*, **30**, 203-224.

— 1948. — Cytologic changes in thymic glands exposed *in vitro* to X-ray. *Amer. J. Path.*, **24**, 1055-63.

Schwarz (G.). — 1909. — Ueber Desensibilisierung gegen Röntgen- und Radium strahlen. *München med. Wschr.*, **56**, 1217-1218.

Smith (D. E.), Patt (H. M.) et Tyree (E. B.). — 1951. — *Nucl. Sci. Abstr.*, **5**, 1719.

— 1951. — *Nucl. Sci. Abstr.*, **5**, 2032.

Sparrow (A. H.) et Rosenfeld (F. M.). — 1946. — X-ray induced depolymerisation of thymonucleohistone and of sodium thymonucleate. — *Science*, **104**, 245.

Stapleton (G. E.) et Hollaender (A.). — 1952. — *Nucl. Sci. Abstr.*, **6**, 1948.

Stearner (S. P.), Christian (E. J. B.) et Brues (A. M.). — 1954. — Protective action of low oxygen tension and epinephrine against X-ray mortality in the Duck. *Amer. J. Physiol.*, **176**, nº 3, 455-460.

Taylor (B.), Greenstein (J. P.) et Hollaender (A. E.). — 1948. — Effect of X-radiation on sodium thymus nucleate. *Arch. Biochem.*, **16**, 19-31.

Thoday (J. M.) et Read (J.). — 1947. — Effect of oxygen on the frequency of chromosome aberrations produced by X-rays. *Nature*, **160**, 608.

Trabert van der Maesen (M.). — 1957. — Étude comparative de la croissance et de la mitose dans des cultures irradiées, avec ou sans traitement préalable à la cystéamine. *C. R. Soc. Biol.* **151**, nos 8-9, 1624-1626.

Trowell (O. A.). — 1952. — The sensitivity of lymphocyts to ionizing radiation. *J. Path. Bact.*, **64**, nº 4, 687-704.

— 1953. — Le rôle du milieu environnant sur la radiosensibilité des ganglions lymphatiques cultivés *in vitro*. *Brit. J. Radiol.*, **26**, nº 306, 302.

Uyeki (E. M.), Leuchtenberger (C.) et Salerno (P. R.). — 1959. — Effect of X-irradiation on the DNA content of individual nuclei of Rabbit bone marrow. *Exper. Cell. Res.*, **17**, nº 3, 405-413.

Van Bekkum (D. W.). — 1956. — The protective action of dithiocarbamate against letal effects of X-irradiation in Mice. *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, **4**, 508-523.

Weiss (J.). — 1944. — Radiochemistry of aqueous solutions. *Nature*, **153**, 748-750.

— 1947. — Some aspects of the action of radiations on aqueous solutions. *Brit. J. Radiol.*, suppl. 1, 56-59.

Weiss (L.). — 1959. — Decrease in radiosensitivity of the intact Mouse spleen produced by hypoxia. *Nature*, **184**, suppl. 15, 1156-1157.
— 1960. — Some effects of hypothermia and hypoxia on the sensitivity of HeLa cells of X-rays. *Inter. J. Rad. biol.*, **2** (1), 20-27.
Wilson (C. W.). — 1959. — Effect of breathing atmospheres of different oxygen concentration upon skin and depilatory reactions produced by X-rays in the legs of Mice. *Brit. J. Radiol.*, **32**, n° 383, 764-767.
Woollam (D. H. M.) et Millen (J. W.). — 1958. — Influence of cysteamine on the teratogenic action of X-radiation. *Nature*, **182**, n° 4652, 1801.
Wolff (Ét.). — 1934. — Recherches expérimentales sur la cyclopie. *Arch. Anat. Hist. Embryol.*, **18**, 145-168.
— 1936. — Les bases de la tératogenèse expérimentale des Vertébrés amniotes, d'après les résultats de méthodes directes. *Arch. Anat. Hist. Embryol.*, **22**, 1-382.
Wolff (Ét.) et Haffen (K.). — 1952. — Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Texas Rep. Biol. Med.*, **10**, 463-472.
Wolff (Ét.) et Kirrmann (J.-M.). — 1954. — L'influence protectrice de la cystéamine contre l'action tératogène des irradiations localisées. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 1629-1631.

# DEUXIÈME THÈSE

## PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Mécanismes d'action des radioprotecteurs.**

Vu et approuvé :

Paris, le 11 mai 1962.

*Le Doyen de la Faculté des Sciences,*

Marc ZAMANSKY.

Vu et permis d'imprimer :

*Le Recteur de l'Académie de Paris,*

Jean ROCHE.